

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

Ras, hSpry2 y PGA_1 : efectos en la inducción de la vía ERK/Elk1 y en la vía de NF- κ B

Carlota A. García Domínguez
Madrid, 2008

Ras, hSpry2 y PGA_1 : efectos en la inducción de la vía ERK/Elk1 y en la vía de NF- κ B

Carlota A. García Domínguez
Licenciada en Bioquímica (UCM)

Directores de Tesis

Dr. José María Rojas Cabañeros Dra. Natalia Martínez Romero
Investigadores Titulares de OPI
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III

Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda, Madrid

José María Rojas Cabañeros y Natalia Martínez Romero, Investigadores Titulares de OPI del Instituto de Salud Carlos III dentro de la Unidad de Biología Celular del Centro Nacional de Microbiología.

CERTIFICAN: que D^a. Carlota A. García Domínguez, licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado:

"Ras, hSpry2 y PGA₁: efectos en la inducción de la vía ERK/Elk1 y en la vía de NF- κ B"

En nuestra opinión, éste trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Madrid, a 3 de noviembre de 2008

José María Rojas Cabañeros
Investigador Titular de OPI

Natalia Martínez Romero
Investigador Titular de OPI



En primer lugar, agradecerle al Dr. José María Rojas, por haberme apoyado desde el principio y haberme aceptado en su laboratorio. Gracias por las charlas de entrenador. Gracias por todas nuestras discusiones, científicas o no, por escucharme siempre y por darme la confianza para hablar con libertad. Gracias por no creer que los becarios pagamos nuestras facturas con Ilusión. Muchas gracias Chema por ser un gran tipo.

Gracias a la Dra. Natalia Martínez Romero. Gracias por la energía y alegría con las que te implicaste en mi tesis. Porque aunque tu voluntad es de hierro, no es lo mejor de ti. Gracias por dejar lo que sea que estuvieses haciendo para ayudarme y escucharme. Gracias por esas tardes de laboratorio en las que te duele el estómago de la risa. Gracias sobre todo por ser mi amiga.

Gracias a Dharma por cuidarme a Rusty. Gracias a los gatos del mundo. Gracias a Richie por resucitar a mi ordenador.

Gracias al Instituto de Salud Carlos III, al FIS y al Plan Nacional I+D.

Gracias al Doctor Alberto Muñoz por la tutoría de mi tesis.

Gracias a la Dra. Dolores Pérez-Sala por acogerme tan bien en tu laboratorio, por enseñarme otra forma de trabajar y a "medir nitritos". Gracias por haberte leído hasta el paper de las nanobaterías! Muchas gracias por todo Lola.

Gracias a los chicos del labo de Lola, a Fran, a Javi y a María Jesús por su ayuda ofrecida siempre con una sonrisa. Gracias a Kosta por su risa fácil y por sus bacterias en metanol, jejeje, eres un genio.

Gracias a Pepe, por mirar con tan buenos ojos mi tesis. Por esos cafetitos y por ser tan perverso como yo. Gracias porque siempre me has animado. Gracias por los cafetitos matutinos y por querer a Elena tanto como yo.

Gracias a la niña de la esquina, Teresa, por los masajitos casi diarios, por compartir las historias surrealistas de su vida, amores incluidos, por mantenernos a Rusty y a mí, la piel tan tersa y por ser la más maja. Sigue jugando, que ya verás como ganas.

Gracias a Encarni por ser tan dulce y relajada. Menos mal que a ti también te prepara los tupperts mamá.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Gonzalo, Andrea, Agustín, Silvia, Natasha, Susana y Laura.

Gracias a Silvia Hernández, por ayudarme con el confocal y decir eso de "sí, sí, está en el núcleo", y por su cariño. Gracias a Diana por su carcajada constante, por su naturalidad y por hacernos tíos.

Gracias a Sara Ballester por tener siempre tiempo para escuchar mis paranoias de NF-KB. Y gracias a la súper-hermana Alicia, por ser tan maja.

Gracias a los Alcamises, en especial a Maria Rosa y a Mayte, por tener siempre tiempo para atenderme y ayudarme con todo lo que han podido.

Gracias a los niños y niñas del tren, Guillermo y sus esquelas, María José y su buen Karma, a Esther su padre pastor y la evolución de Máximo Sandín, David y su sentido del humor, Lorena la argentina más dicharachera, Daniel y sus "es que lo que pasa es", Ana y sus reclamaciones. Gracias por hacer mis largas horas de cercanías y de "Ls" tan interesantes.

Gracias a pin y pon, porque es un gusto encontrárselas a la hora de la galleta. Gracias a Dario y su peculiar sentido de la vida. Gracias a Inma, por ser la persona que siempre está alegre y que siempre tiene tiempo para ayudarme. Gracias a Toraño y a Merche, esos vampirillos.

Gracias a Toñi y a Mari, ¡ay! Si vosotras gobernaseis el país lo mucho mejor que iría la ciencia. Gracias por alegrar tanto mis tardes. A Farida por su bellísima inocencia y a Adrián por ser tan salao. Gracias al personal de la biblioteca del Carlos III de Majadahonda por conseguirme todos los artículos que les he pedido. Gracias a los súper-informáticos por intentar ayudarme siempre. Gracias a toda la gente del Carlos III y del CIB que me ha echado una mano.

Gracias a mis amigos, chequead la versión beta.

A los mejores suegros, hermanos y tíos de hecho del mundo, también conocidos como la familia-piña-gallega. Muchas gracias por acogerme, mimarme y cuidarme tantísimo.

A mi hermano, a Mari Ángeles, a Irene y a Diego por estar en mi vida. A mi tía Carmen y a la súperfamilia leonesa. Gracias a mi tío Ricardo y a mi tío Carlos, que tan orgullosos hubiesen estado de mí. Gracias a mis abuelas.

A mis papis, porque contrataron Europa15, porque subvencionaron mi independencia, por los túpers (Natalia sólo tenía envidia), por gestionar mis finanzas, por las 4 horas en el aparcamiento del DÍA, por los achuchones, por los mimos y por todo el cariño.

A mi boliche, al papa, al gallego, a JP, a la guindita en top de la creme de la creme, al solomillo, al puntito sobre mi i, a mi churri. Por quererme tanto, desde todos los rincones del mundo, por ser tan cursi y porque siempre sabe cómo hacerme reír. El resto te lo digo luego...JED

En trabajos previos, los grupos de los doctores Pérez-Sala, Boscá y Rojas, demostraron que H-Ras se activa por la unión de la prostaglandina ciclopentenona (cyPG) 15dPGJ₂ mediante la formación de un aducto de Michael. En esta tesis, se muestra que la cyPG PGA₁ se une a H-, N- y K-Ras-4B, formando también un aducto de Michael, con una estequiometría 3:1, 2:1, y 1:1, respectivamente. PGA₁ no sólo se une a estas tres isoformas de Ras sino que también las activa, siendo la cisteína 118 la más importante en la activación de Ras por PGA₁.

hSprouty2 (hSpry2) es una proteína capaz de inhibir la vía de ERK-Elk1 inducida por diversos factores de crecimiento como FGF. En esta tesis, se demuestra que hSpry2 también puede bloquear la activación de ERK-Elk1 por PGA₁. hSpry2 no inhibe la activación de Ras inducida por PGA₁.

También se ha demostrado que, en células HeLa, la sobreexpresión de hSpry2-Y55F produce un aumento de la activación transcripcional de NF-κB, que es inhibida totalmente por la co-transfección con el súperrepresor IκBα-32-36. Hemos encontrado que tanto hSpry2-wt, como el mutante Y55F, interaccionan *in vivo* con TRAF2, una proteína clave en la transducción de señales desde TNFRs. La sobreexpresión conjunta de TRAF2 y hSpry2-Y55F activa sinérgicamente a NFκB en ausencia de estimulación. hSpry2-wt y hSpry2-Y55F interaccionan con p65 *in vivo*, no obstante se desconoce si esta interacción se da en localizaciones citoplasmáticas o nucleares, localizaciones en las cuales se ha detectado la presencia de hSpry2. Ensayos EMSA con células SW480-ADH, muestran que la sobreexpresión de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F, influye en la naturaleza de los dímeros NF-κB que se activan. No obstante, el mecanismo de actuación de hSpry2 sobre esta vía está aún por definir.

Previous work, by the groups of Pérez-Sala, Boscá and Rojas, has pointed out that the 15dPGJ₂ cyclopentenone prostaglandin (cyPG) activates H-Ras through a covalent modification of Ras by a Michael addition. This thesis shows that PGA₁ cyPG binds H-, N- and K-Ras-4B through a Michael reaction, being the stoichiometry for each of the Ras isoforms 3:1, 2:1 and 1:1 respectively. PGA₁ not only binds Ras isoforms but it activates them as well, being the 118 cysteine the most important residue for Ras activation.

hSprouty2 protein (hSpry2) down-regulates FGF-dependent ERK-Elk1-activation. This thesis shows that hSpry2 blocks PGA₁ ERK-Elk1 activation. hSpry2 does not inhibit Ras activation by PGA₁.

In addition, it has also been proven that hSpry2-Y55F overexpression in HeLa cells activates NF-κB. The effect of hSpry2-Y55F on the NF-κB pathway is abrogated by the superrepressor IκBα-32-36. Co-immunoprecipitation experiments, show an interaction between TRAF2, a key protein in the TNFα-NF-κB pathway, and both hSpry2-wt and hSpry2-Y55F. Overexpression of TRAF2 and hSpry2-Y55F simultaneously, activates NF-κB synergistically in absence of any stimulus. hSpry2-wt and hSpry2-Y55F interact with p65 *in vivo*, however it has not been tested if it does with cytoplasmatic or nuclear p65, localizations in which we have detected Sprouty proteins. In SW480 cells, EMSA assays show that overexpression of hSpry2-wt and hSpry2-Y55F does affect which NFκB dimer becomes activated. The mechanism by which hSpry2 affects the NFκB pathway has not been established yet.

Índice

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	11
1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y RECEPTORES TIROSINA QUINASA	11
2. RAS Y LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	12
2a. LAS PROTEÍNAS RAS	14
3. SPROUTY, UN REGULADOR NEGATIVO DE RTKs	15
3a. LAS PROTEÍNAS SPROUTY EN MAMÍFEROS	16
3b. SPROUTY EN LA INHIBICIÓN DEL FGFR	18
3c. SPROUTY Y SUS IMPLICACIONES PATOLÓGICAS	19
4. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B	20
4a. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α	22
4b. COMPLEJO I: EL PAPEL DE TRAF2 Y DE LA UBIQUITINA	23
4c. MAPKs Y TNF α	25
4d. NF- κ B EN CÁNCER	26
5. PROSTAGLANDINAS	27
5a. PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS	28
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
1. LA CICLOPENTENONA PGA ₁ Y LAS ISOFORMAS DE RAS	45
1a. MODIFICACIÓN DE H-RAS POR 15DPG ₂ Y PGA ₁ BIOTINILADAS <i>IN VITRO</i>	47
1b. PGA ₁ ACTIVA A H-RAS <i>IN VIVO</i>	48
1c. PGA ₁ MODIFICA A H-RAS <i>IN VIVO</i>	50
1d. PGA ₁ TAMBIÉN ACTIVA A N-RAS Y K-RAS <i>IN VIVO</i>	51

2. EFECTO DE SPROUTY SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ERK INDUCIDA POR LA CICLOPENTENONA PGA_1	52
2a. hSPRY2 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ELK-1 INDUCIDA POR PGA_1	53
2b. hSPRY2 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK INDUCIDA POR PGA_1	54
2c. NO SE DETECTA LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE hSPRY2 POR PGA_1	56
2d. EFECTO DE SPROUTY EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NF- κ B MEDIADA POR PGA_1	57
3. SPROUTY EN LA VÍA DE NF- κ B.....	59
3a. EL SUPERREPRESOR I κ B α -32-36 INHIBE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B INDUCIDA POR LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2-Y55F	60
3b. NO SE DETECTA LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE hSPRY2 POR TNF α	61
3c. LA SOBREEXPRESIÓN CONJUNTA DE TRAF2 Y hSPRY2-Y55F ACTIVA TRANSCRIPCIONALMENTE A NF- κ B DE FORMA SINERGÍSTICA	62
3d. LA SOBREEXPRESIÓN DE TRAF2 INHIBE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE ELK1 INDUCIDA POR FGF	63
3e. TRAF2 CO-LOCALIZA PARCIALMENTE CON hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F	64
3f. TRAF2 INTERACCIONA <i>IN VIVO</i> CON SPRY2.....	66
3g. Δ TRAF2 INTERACCIONA <i>IN VIVO</i> CON hSPRY2.....	68
3h. EL MUTANTE PQD DE hSPRY2 INTERACCIONA <i>IN VIVO</i> CON TRAF2	70
3i. hSPRY2 INTERACCIONA <i>IN VIVO</i> CON p65	73
3j. LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F EN CÉLULAS HeLa NO AFECTA AFECTA A LA NATURALEZA DE LOS DÍMEROS NF- κ B QUE SE UNEN A UN SITIO CONSENSO κ B	73
3k. LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F EN CÉLULAS SW480-ADH SÍ AFECTA A LA NATURALEZA DE LOS DÍMEROS NF- κ B QUE SE UNEN A UN SITIO CONSENSO κ B	77
3l. LA SOBREEXPRESIÓN hSPRY2-Y55F TAMBIÉN AFECTA A LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B EN CÉLULAS SW480-ADH	81
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	91
ARTÍCULOS	95

Acrónimos y Abreviaturas



**Acrónimo/
Abreviatura****Significado**

15dPGJ₂	15-deoxi- Δ 12,14-PGJ ₂
AA	Ácido Araquidónico
ADAM	A Desintegrin and Metalloproteinase protein
ASK	Apoptosis Signal-Regulating Kinase
Bcl-3	B-cell CLL/lymphoma 3 protein
CBP	CREB-Bindind Protein
c-Cbl	Casitas B-Lineage Lymphoma protein
cIAP1	cellular Inhibitor of Apoptosis 1
Cin85	c-Cbl-interacting protein 85
COX	Ciclooxigenasa
CSK	Casein-kinase
cyPG	ciclopentenona Prostaglandina
DAG	Diacilglicerol
DD	Death Domain
DIC	Contraste Interdiferencial
DMBA	7,12-Dimetil BenzaAntraceno
EC	Extractos Celulares
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
eIF4A	eukaryotic translation Initiation Factor 4A
EM	Espectrometría de Masas
EMSA	Electromobility Shift Assay, ensayos de retardo en gel
ERK	Extracellular-signal Related Kinase
FADD	FAS-Associated Death Domain
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	FGF Receptor
GAP	GTPase-Activating Protein
GCK	Germinal Center Kinase
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2.
GST	Glutation S-Transferasa
HeLa	Células de Henrietta Lacks
H-Ras	Harvey-Rous Avian Sarcoma
IB	Inmunoblot
IκB	Inhibitor of I κ B
IKK	I κ B-Kinase
IP	Inmunoprecipitación
IL-10	Interleukina 10
JNK	c-jun N-Terminal Kinase
Keap	Nrf-2/Kelch-like ECH-associating protein

K-Ras	Kirsten-Rous Avian Sarcoma
KO	Knock-Out
LMP1	Proteína Latente de Membrana del virus Epstein-Bar
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MATH	Meprin and TRAF homology domain
MCP	Membrane cofactor protein
MEF	Mouse Embrionic Fibroblast
MEK	MAP-ERK Kinase (MAP2K)
MEKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K)
MKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MAP2K)
MNK	MAPK-interacting Kinase
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NF1	Neurofibromina 1
NF-κB	Nuclear Factor κ B
NIK	NF- κ B Inducing Kinase
N-Ras	Neuroblastoma-Rous Avian Sarcoma
ORF	Open Reading Frame
PD	Pull-Down
PDK	3'-phosphoinositide-dependent kinase
PG	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
PGA₁	Prostaglandina A ₁
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTB	Phospho-Tyrosine Binding domain
Raf	Ras-activated factor
Ral	Ras-related protein
Ras-GRF	Ras-Guanine Releasing Factor
Ras-GRP	Ras-Guanine Releasing Protein
RBD	Ras-Binding Domain
RE	Retículo endoplasmático
Rel	Proteína relacionada con el oncogen de reticuloendoteliosis
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
RIN1	Ras and Rab interacting protein-1
ROS	Reactive Oxygene Species
RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
RTK	Receptor Tirosina Kinasa
SH2	Src homology 2 domain
SIAH2	Seven in Absentia Homolog 2
SODD	Silencer of Death Domain

SOS	Son of Sevenless
SPRED	Spry related protein
Spry	Sprouty
SRC	Proteína Rous sarcoma virus
t.a.	temperatura ambiente
TAB	TAK-Binding Protein
TACE	TNF α Converting Enzyme
TAK	TGF β -Activated Kinase
TPA	Phorbol diester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
TIAM-1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-1
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TNFR I	TNF α Receptor I
TNFR II	TNF α Receptor II
TRADD	TNFR I-Associated Death Domain
TRAF	TNFR-Associated Factor
TRX	Tiorredoxina
UB	Ubiquitina
Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
Uev1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vs.	En comparación con
Y55F	Mutante en la tirosina 55 de hSprouty2

Introducción



1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y RECEPTORES TIROSINA QUINASA

Las vías de transducción de señales conectan la activación de los receptores de la superficie celular con los procesos transcripcionales que regulan proliferación, diferenciación, apoptosis, migración y metabolismo celular. Los Receptores Tirosina Quinasa (RTKs) son proteínas transmembrana con un dominio enzimático tirosina quinasa en su extremo intracelular (Pawson, 2002; Haugh *et al.*, 2002; Di Fiore *et al.*, 2001). Los RTKs dimerizan cuando se unen sus ligandos extracelulares, como los factores de crecimiento epitelial (EGF), de fibroblastos (FGF) o de epitelio vascular (VEGF) (Figura 1). La dimerización de los RTKs provoca su activación y su autofosforilación en residuos de tirosina, residuos que sirven de anclaje a proteínas con dominios de unión a fosfo-tirosinas (PTB) (Schlessinger, 2000). Estas proteínas tienen funciones adaptadoras, como Grb2 que recluta a Sos a la membrana, o son enzimas que se activan por su unión a los RTKs, como PLC γ o PI3K.

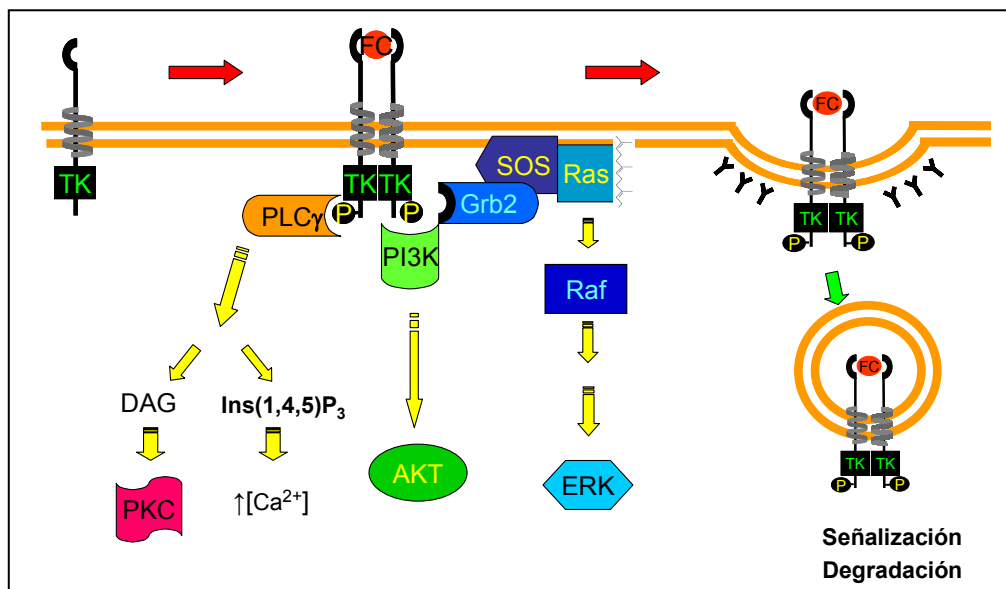


Figura 1. Activación de los Receptores Tirosina Quinasa por factores de crecimiento (RTKs). Tras la unión del factor de crecimiento, los RTKs dimerizan y se produce la autofosforilación de los mismos, esta fosforilación sirve de anclaje a otras proteínas. Los receptores activados son endocitados para su degradación. Algunos receptores son capaces de señalizar desde las vesículas endocíticas.

La duración e intensidad de una ruta de señalización debe estar estrictamente regulada puesto que una activación aberrante puede dar lugar a la aparición de tumores y otras patologías (Bache *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2000). Esta regulación se produce de diversas formas: por la endocitosis del receptor que mediada por un conjunto de proteínas, como c-Cbl que ubiquitina al receptor de EGF (Haglund *et al.* 2003; Mosesson *et al.*, 2003), por la inactivación del receptor mediada por tirosina fosfatasas (Ostman y Bohmer, 2001), o por la intervención de proteínas que atenúan la activación de vías efectoras como por ejemplo Sprouty2 (Spry2) (Cabrita y Christofori, 2008).

2. RAS Y LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las proteínas Ras son GTP-asas con una masa molecular de aproximadamente 21 KDa. Oscilan entre un estado inactivo y otro activo, dependiendo de si están unidas a nucleótidos de guanosina difosfato (GDP) o trifosfato (GTP) respectivamente. El estado de activación de Ras está controlado por dos grupos de proteínas: GEFs y GAPs (Figura 2A). Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), promueven la disociación del GDP de Ras, lo que facilita que se una en su lugar el GTP que es más abundante en la célula. Por otro lado, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) estimulan la actividad GTPasa intrínseca de Ras, es decir, promueven que Ras hidrolice el GTP quedándose unido a GDP. En mamíferos se han identificado tres grupos de proteínas Ras-GEF: Sos (Sos1 y Sos2), Ras-GRF (Ras-GRF1 y Ras-GRF2) y Cal-DAG/Ras-GRP (Cal-DAG-II/Ras-GRP1 y Cal-DAG-III/Ras-GRP3); en cuanto a las GAPs, existen dos grupos principales p120GAP y NF1 (Rojas y Santos, 2006).

Todas las proteínas G tienen una estructura conservada en las zonas de interacción con GDP/GTP, llamadas "motivos G" (Figura 2C; Wennerberg *et al.*, 2005). Ras-GDP y Ras-GTP tienen conformaciones distintas, especialmente en las regiones llamadas switch I y switch II (Figura 2B; Tong *et al.*, 1991; Boriack-Sjodin *et al.*, 1998). La región switch I de Ras-GTP, es la zona principal de reconocimiento de los efectores de Ras, es decir, de aquellas proteínas que deben continuar con la señal intracelularmente. Estas proteínas poseen un dominio de unión a Ras-GTP (Ras-Binding Domain: RBD; Herrmann *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997). Ras-GTP puede activar distintas cascadas de señalización siendo las más estudiadas la vía de Raf-MEK-ERK, la vía de PI3K y la vía de Ral-GDS. Otras proteínas efectoras de Ras menos conocidas incluyen a Rin-1 (Colicelli *et al.*, 1991), Tiam1 (un GEF de otra GTPasa monomérica de la familia de Ras llamada Rac; Lambert *et al.*, 2002) y PLC ϵ (Kelley *et al.*, 2001).

Ras activo dirige a Raf a la membrana plasmática donde Raf se activa (Kikuchi *et al.*,

1994), Raf activado fosforila a MEK1 y MEK2 y éstas, a su vez, fosforilan a ERK1 y ERK2, que pueden entonces translocarse al núcleo. ERK es una quinasa con substratos citoplasmáticos y nucleares. Entre los primeros están Sos (Chen *et al.*, 1996), Mnk (Waskiewicz *et al.*, 1997) o Rsk (Gavin *et al.*, 1999) y, entre los nucleares, diversos factores de transcripción como Elk-1 (Marais *et al.*, 1993) o c-Myc (Gupta *et al.*, 1993).

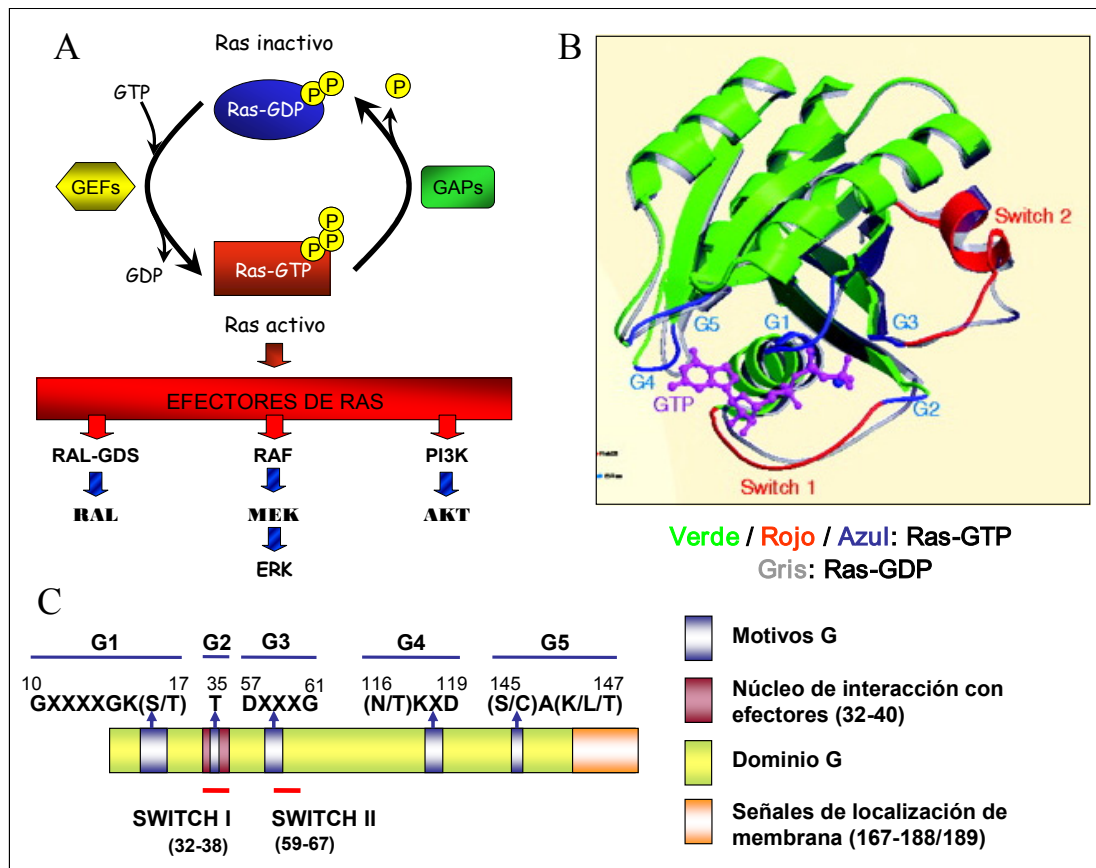


Figura 2. (A) Ciclo de activación de Ras. Ras-GTP es capaz de interactuar con sus efectores iniciando así distintas cascadas de señalización. **(B) Estructura tridimensional de Ras y diferencias en la conformación entre Ras-GDP Y Ras-GTP.** Las zonas de Ras que sufren un mayor cambio en su conformación son las regiones switch I y II (rojo). Los motivos G1-G5, de interacción con el nucleótido, están representados en azul. Esta figura ha sido tomada de Wennerberg *et al.*, 2005. **(C) Estructura de Ras esquematizada.** El dominio G comprende a las regiones más conservadas de las proteínas Ras. En el extremo C-terminal están las señales de localización en membrana que se describen en el texto más adelante.

La fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) tras su interacción con Ras, fosforila a 4,5-P₂-fosfoinosítoles de la membrana plasmática interna en la posición D3 del anillo inositol, para producir 3,4,5-P₃-fosfoinosítoles (PI3Ps) (Carpenter y Cantley, 1996). Los PI3Ps reclutan a la quinasa AKT/PKB a la membrana permitiendo su fosforilación por PDK1 (Alessi *et al.*, 1997). La señalización de AKT es crítica en la supervivencia celular ya que inhibe vías apoptóticas (Shi *et al.*, 2004, Gupta *et al.*, 2004, Wendel *et al.* 2004).

Ral-GDS es un GEF de Ral, otra GTPasa monomérica de la familia de Ras, que se activa

por mediación de Ras-GTP (Spaargaren y Bischoff, 1994; Wolthuis *et al.*, 1998). Ras está involucrado en la regulación del ciclo celular (Henry *et al.*, 2000), en la endocitosis mediada por receptor (Nakashima *et al.*, 1999), en la activación de PLD1 (Frankel *et al.*, 1999), en la regulación del citoesqueleto de actina (Ohta *et al.*, 1999) y en la activación de Src (Goi *et al.*, 2000).

Ras es importante en muchos procesos fisiológicos como en proliferación (Costa *et al.*, 2008), diferenciación (Takahashi *et al.*, 2003), motilidad (Alexandrova *et al.*, 2006), tráfico intracelular (Giovannardi *et al.*, 2002), morfogénesis (Kumar *et al.*, 2005) y respuesta inmune (Pérez de Castro *et al.*, 2003 y 2004). Ras es también importante en procesos patológicos como el desarrollo de tumores, de hecho fue uno de los primeros oncogenes identificados. Se han encontrado mutaciones de alguno de los genes *ras* en un 30% de los tumores humanos, incluyendo sarcomas, carcinomas, neuroblastomas, leucemias y linfomas (Lowy y Willumsen, 1993; Campbell *et al.*, 2004).

2a. LAS PROTEÍNAS RAS

La familia de proteínas Ras incluye a las isoformas H, N, K-Ras4A y K-Ras4B (Rojas y Santos, 2002). Comparten una homología del 100% en los 85 aminoácidos del extremo N-terminal, que disminuye hasta el 80% en los residuos 85-165 (región variable) y hasta el 15% en los residuos C-terminales restantes (región hipervariable).

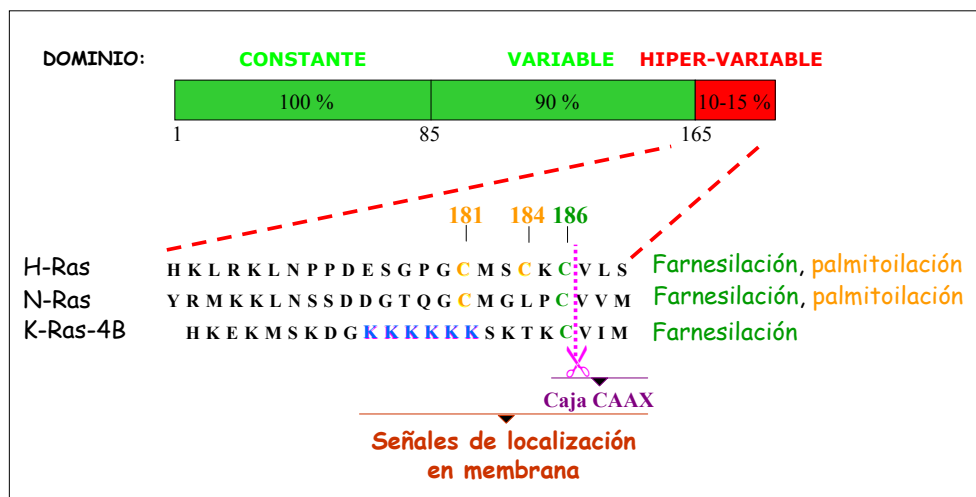


Figura 3. Estructura y modificaciones postraduccionales de las isoformas de Ras. Las cisteínas farnesiladas aparecen en verde, y las palmitoiladas en naranja. Las región de polilisinas en K-Ras-4B aparecen en azul. La raya punteada rosa indica el lugar de proteólisis en la caja CAAX.

K-Ras presenta dos variantes en la región hipervariable, K-Ras4A y K-Ras4B, originadas por un procesamiento alternativo del exón 4 (a partir de este momento cuando se mencione a K-ras se referirá a K-Ras4B). Las proteínas Ras se procesan pos-

traduccionalmente. Las tres isoformas se farnesilan en la cisteína C-terminal comprendida en el motivo denominado "caja CAAX" (A representa un aminoácido alifático y X metionina o serina; Hancock *et al.*, 1989 y 1991a). El procesamiento continúa con el corte proteolítico de los residuos AAX y la carboxi-metilación de la cisteína (Figura 3) (Hancock *et al.*, 1991b). H- y N-Ras se palmitoilan, H en las cisteínas 181 y 184, y N en la única cisteína disponible que posee en la región hipervariable, la 181 (Hancock *et al.*, 1989). K-Ras 4B, sin embargo, posee una serie de lisinas con las que interacciona electrostáticamente con fosfolípidos de membrana (Hancock *et al.*, 1990; Wright y Philips, 2006).

Las proteínas Ras deben estar asociadas a membrana para ser funcionales (Willumsen *et al.*, 1984). Las isoformas de Ras se encuentran en membrana plasmática, retículo endoplasmático, Golgi y mitocondria (Rocks *et al.*, 2005; Arozarena *et al.*, 2004; Bivona *et al.*, 2006). La isoprenilación es la responsable de anclar a Ras a la membrana, mientras que las otras modificaciones son las que rigen su localización en membrana plasmática o en membranas de orgánulos subcelulares. H- y N-Ras oscilan entre la membrana plasmática y Golgi siguiendo ciclos de despalmilación-palmilación, siendo el tiempo de residencia en membrana plasmática mayor con la di-palmilación (Rocks *et al.*, 2005). La fosforilación de K-Ras por PKC en una serina de la región hipervariable, induce su translocación de la membrana plasmática a retículo endoplasmático, Golgi y mitocondria (Bivona *et al.*, 2006).

Se pensaba que las isoformas de Ras tenían funciones redundantes, sin embargo, muchos datos apuntan a que esto no es así. La pérdida del gen *K-ras* es letal en ratones mientras que la de los genes *H-* y *N-ras* no lo es (Esteban *et al.*, 2001), la activación de las isoformas de Ras es dependiente del estímulo y del tipo celular (Millán *et al.*, 2003; Ehrhardt *et al.*, 2004), cada isoforma de Ras activa más potentemente determinadas vías efectoras (Voice *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2007; Millán *et al.*, 2003) y distintos tumores presentan distintas alteraciones para una determinada isoforma de Ras (Lowy y Willumsen, 1993; Campbell y Der, 2004). Parece que estas diferencias entre las isoformas de Ras se deben, en gran parte, a su distinta localización subcelular tanto en microdominios de la membrana plasmática (Hancock y Parton, 2005; Arozarena *et al.*, 2004), como en endomembranas (Chiu *et al.*, 2002; Pérez de Castro *et al.*, 2004).

3. SPROUTY, UN REGULADOR NEGATIVO DE RTKs

Las proteínas Sprouty (Spry) son reguladores de las rutas de señalización mediadas por RTKs. Spry fue identificado en un análisis genético en *Drosophila melanogaster*, como un regulador negativo de la activación de ERK inducida por FGF (Hacohen *et al.*, 1998). La

sobreexpresión de dSpry disminuye la ramificación traqueal mientras que la pérdida de función resulta en una hiper-ramificación. La proteína dSpry inhibe la señalización mediada por los RTKs, pero además, es la propia ruta de señalización la que induce la expresión de dSpry, sugiriendo para esta proteína un papel de regulador de retroalimentación negativo (Hacohen *et al.*, 1998).

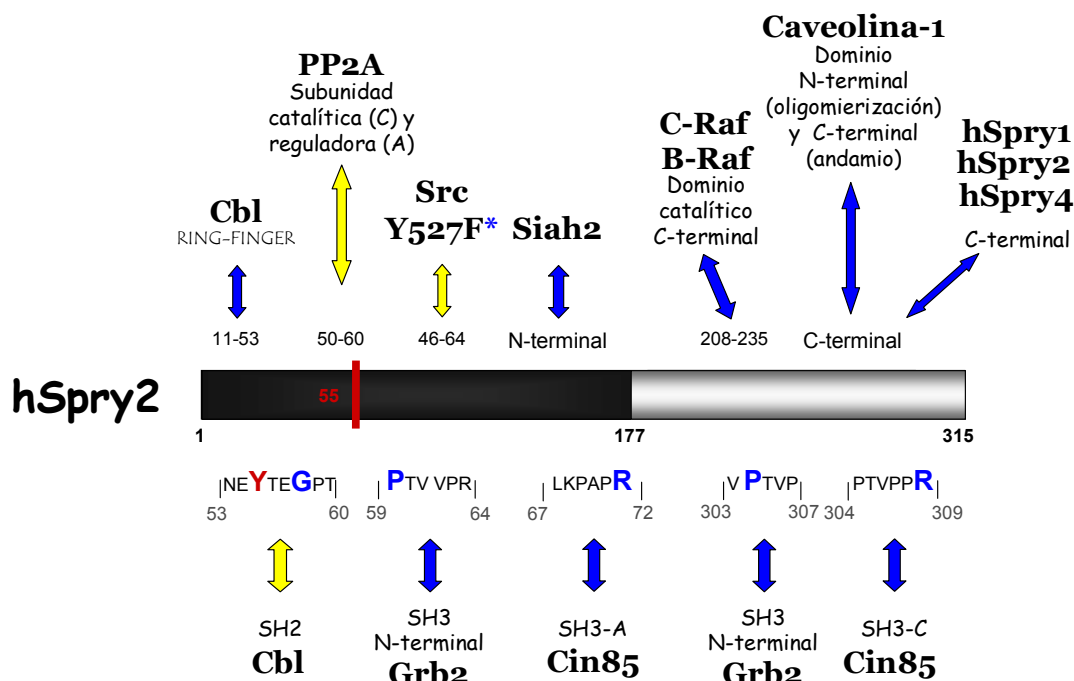
dSpry no sólo afecta a la activación de ERK inducida por el FGFR sino también por el EGFR. En el desarrollo de la glía, de las neuronas y de los ojos en *Drosophila*, el EGFR juega un papel muy importante y en todos estos tejidos, la pérdida de función de dSpry durante el desarrollo provoca un aumento del número de células en estos tejidos (Kramer *et al.*, 1999; Casci *et al.*, 1999). La activación del EGFR promueve la expresión de dSpry en las células de los folículos del ovario y en el disco imaginal del ala (Reich *et al.*, 1999). La sobreexpresión de dSpry en estos tejidos produce fenotipos similares a la pérdida de función del EGFR.

3a. LAS PROTEÍNAS SPROUTY EN MAMÍFEROS

En mamíferos existen cuatro isoformas de Spry. Todas las proteínas Spry, independientemente de la especie y de la isoforma, presentan una alta homología en su extremo C-terminal, una región rica en cisteínas llamado "dominio Sprouty" que es característico de la familia de proteínas Spry y Spred (Figura 4) (Wakioka *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2000). Este dominio, además de ser el responsable de la localización en membrana de Spry dependiente de la estimulación por factores de crecimiento, contiene un dominio de unión a Raf y es la zona por donde las proteínas Spry dimerizan (Sasaki *et al.*, 2001; Tefft *et al.*, 2002, Hanafusa *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2002).

Las proteínas Spry de mamíferos tienen una masa molecular de aproximadamente 35 kDa. De todas las isoformas, Spry2 es la que presenta una mayor homología entre especies (Minowada *et al.*, 1999). Dentro del extremo N-terminal, existe una tirosina conservada en todas las isoformas que se corresponde con la posición 55 en hSpry2. Estudios con un dominante negativo de la tirosina-quinasa Src, con inhibidores químicos y con células que no expresan las quinasas más ubicuas de la familia de Src, sugieren que la fosforilación del residuo 55 de hSpry2 es debida a Src o a una quinasa de esta familia (Rubin *et al.*, 2005, Mason *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2004).

En mamíferos, Spry también está relacionado con el desarrollo de estructuras ramificadas como el desarrollo pulmonar y la angiogénesis (Tefft *et al.*, 1999; Perl *et al.*, 2003; Impagnatiello *et al.*, 2001). Sin embargo, es una cuestión controvertida para qué RTKs es específico Spry en mamíferos. La inhibición que Spry1 y Spry2 ejercen en la activación de ERK mediada por FGF y VEGF está ampliamente descrita en la bibliografía



Interacción		Referencia
B-Raf		Tsavachidou <i>et al.</i> , 2004
Caveolina		Cabrita <i>et al.</i> , 2006
c-Cbl	Ring finger	Wong <i>et al.</i> , 2001
	SH2	Rubin <i>et al.</i> , 2003; Fong <i>et al.</i> , 2003; Mason <i>et al.</i> , 2004
Cin85		Haglund <i>et al.</i> , 2005
Grb2		Martínez <i>et al.</i> , 2007
PP2A		Lao <i>et al.</i> , 2007
c-Raf		Sasaki <i>et al.</i> , 2003; Tefft <i>et al.</i> , 2002
Siah2		Nadeau <i>et al.</i> , 2007
Spry 1,2 y 4		Hanafusa <i>et al.</i> , 2002; Mason <i>et al.</i> , 2004; Sasaki <i>et al.</i> , 2001; Nadeau <i>et al.</i> , 2007
Src Y527F*		Li <i>et al.</i> , 2004

Figura 4. Estructura de la proteína hSpry2 y descripción de los sitios de interacción con otras proteínas. La región entre los aminoácidos 1 y 177 (en negro) se corresponde al fragmento aceptado como región N-terminal de Spry, la zona gris se corresponde con la región C-terminal. Dentro de la región C-terminal está el dominio Spry. En el gráfico figuran las proteínas descritas que interaccionan con hSpry2, junto con la regiones o dominios de ambas proteínas que intervienen en la unión. Cuando la zona de hSpry2 implicada consiste de un pequeño número de aminoácidos, la secuencia de estos aparece especificada, si no, se indica la región. Cuando existe un aminoácido crítico para la interacción, éste aparece resaltado en azul. Está señalada en rojo la posición de la tirosina 55 por su especial relevancia. Las flechas azules indican que la unión es constitutiva y las amarillas que es inducida por un factor de crecimiento, EGF o FGF. En la tabla inferior aparece un listado de referencias que indican la publicación en la que dicha interacción ha sido descrita.

*La interacción fue mapeada usando péptidos sintéticos. Esta interacción sólo se detectó con el mutante hiperactivo de Src Y527F.

Impagnatiello *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001). Los mioblastos murinos no diferencian a miotubos en presencia de FGF debido a la activación de ERK, sin embargo, la sobreexpresión de hSpry2 permite que sí lo hagan (de Álvaro *et al.*, 2005).

Distintos datos apuntan a que Spry juega también un papel en la ruta mediada por el EGFR. hSpry2 se transloca a la membrana plasmática tras la estimulación por EGF (Lim *et al.*, 2000) e inhibe distintos procesos biológicos inducidos por EGF como la proliferación en células endoteliales o la migración de células HeLa (Impagnatiello *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2001; Yigzaw *et al.*, 2001). Tanto EGF como FGF promueven la expresión de Spry endógeno (Sasaki *et al.*, 2001, Rubin *et al.*, 2005).

Varios autores sugieren que hSpry2 no sólo no inhibe la activación de ERK inducida por EGF, sino que aumenta la duración de la misma sin afectar a su intensidad (Wong *et al.*, 2002; Egan *et al.*, 2002). Este efecto es debido a la interacción de hSpry2 con c-Cbl, una E3 ubiquitina ligasa implicada en la atenuación de la señalización por el EGFR (Rubin *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003). La estimulación con EGF promueve la fosforilación en la tirosina 55 de hSpry2, cuya substitución por fenilalanina comporta un fenotipo dominante negativo (Sasaki *et al.*, 2001). En este modelo, la fosforilación del residuo 55 sirve como señal de reconocimiento para la interacción de hSpry2 con un dominio PTB de c-Cbl. La competición entre el EGFR y hSpry2 por la unión a c-Cbl, impide que c-Cbl medie la degradación de EGFR, por lo que la activación de ERK es sostenida. Sin embargo, esto no se ha confirmado en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) c-Cbl^{-/-} y c-Cbl^{+/+}, donde la fosforilación de ERK inducida por EGF es inhibida en ambos tipos de células (Mason *et al.*, 2004). También se ha sugerido que, por un mecanismo independiente de c-Cbl, hSpry2 interfiere en la transición endosoma-temprano/endosoma-tardío del EGFR, estando retardada la degradación del receptor activado (Kim *et al.*, 2007a).

3b. SPROUTY EN LA INHIBICIÓN DEL FGFR

El mecanismo de acción de Spry en la ruta señalización de FGF es igual de controvertido que en la ruta de EGF. Se ha propuesto que la unión de Spry a Grb2 inducida por FGF impide la unión de Sos a Grb2 (Lao *et al.*, 2006), o a otras proteínas adaptadoras necesarias en la señalización por FGFR (Hanafusa *et al.*, 2002), bloqueándose la activación de Ras y, por tanto, de ERK. No obstante, también se ha descrito que el complejo Grb2/SOS no se ve afectado por las proteínas Spry (Gross *et al.*, 2001), que mutantes de hSpry2 incapaces de unir Grb2 mantienen sus propiedades inhibitorias (Martínez *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2004) y que hSpry2 es capaz de inhibir la vía de ERK incluso en presencia de mutantes hiperactivos de Ras (Yusoff *et al.*, 2002 y datos no publicados de la

Dra. Martínez).

Se ha sugerido que la unión de Spry a Raf es lo que impide la activación de ERK (Tsavachidou *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2003). Spry2 se une a B-Raf (Tsavachidou *et al.*, 2004) y a C-Raf (Sasaki *et al.*, 2003). En células de melanoma, la supresión de Spry2 endógeno por siARN, aumenta el grado de fosforilación de ERK, mientras que en células de melanoma con la mutación oncogénica V599E en B-Raf, residuo indispensable para su unión a Spry2, la activación de ERK no se ve afectada por el uso de siARN de Spry2 (Tsavachidou *et al.*, 2004).

En lo que coinciden todos los autores hasta ahora, es que la mutación de la posición 55 de Spry2 provoca la pérdida de su capacidad de inhibir la activación de ERK inducida por FGF. Todavía no se ha conseguido cristalizar ninguna de las proteínas Spry2, así que se desconocen los efectos que esta mutación provoca en la estructura de esta proteína, sin embargo, este mutante sobreexpresado presenta la misma localización subcelular que la versión silvestre independientemente de la estimulación mitogénica (Mason *et al.*, 2004).

La tirosina 55 de hSpry2 es clave para su interacción con la proteína c-Cbl (Rubin *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003), con las subunidades catalítica y reguladora de PP2A (Lao *et al.*, 2007) y con Src (Li *et al.*, 2004). Estas interacciones son dependientes de la fosforilación de esta tirosina tras la estimulación con FGF o EGF. Al contrario de lo que ocurre con el EGFR, no existen publicaciones que relacionen la degradación del FGFR con c-Cbl, así que se ignora que impacto puede tener la interacción Spry2 con c-Cbl sobre esta ruta de señalización.

Una novedosa hipótesis propone que la proteína hSpry2 oligomeriza formando nanopartículas de 24 polipéptidos, uniendo cationes de hierro a través de las múltiples cisteínas presentes en su región C-terminal, que quedarían aislados del entorno celular y por tanto serían capaces de almacenar energía eléctrica (Wu *et al.*, 2005). Cómo estas “nano-baterías” afectarían a la ruta de FGF está todavía por aclarar.

3c. SPROUTY Y SUS IMPLICACIONES PATOLÓGICAS

hSpry2 es un claro candidato para ser un supresor tumoral, además de un posible marcador diagnóstico, por su capacidad de limitar la señalización promovida por factores de crecimiento. No existen estudios a gran escala en los que se evalúe la sobre o infraexpresión de Spry en tumores y, por lo tanto, suficientemente relevantes estadísticamente. No obstante, existen publicaciones que, usando un reducido panel de tumores y de líneas celulares tumorales, describen una disminución en la expresión de hSpry2 y/o de hSpry1 en tumores de mama, de próstata y de hígado, en comparación con tejidos sanos análogos (Lo *et al.*, 2006; Kwabi-Addo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). En

tumores de pulmón no microcíticos, Spry se ha visto infraexpresado en el 63% de los mismos (Sutterlüty *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007), mientras que en pacientes con tumores de mama esta cifra asciende hasta el 90% (Lo *et al.*, 2004). En líneas tumorales de melanoma, Spry está sobreexpresado en aquellas líneas con la mutación oncogénica V599E de B-Raf en comparación con aquellas con B-Raf-wt y con melanocitos. Esta mutación en B-Raf, que impide su unión a hSpry2, aparece en el 90% de los tumores en los que B-Raf está mutado (Tsavachidou *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2002). La activación constitutiva de ERK, probablemente sea la causante del aumento de la expresión de hSpry2 en estos tumores. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el promotor de hSpry2 está hipermetilado en el 37% de los linfomas B difusos humanos, lo que posiblemente se relacione con el grado de supervivencia (Sánchez *et al.*, 2008). Spry podría tener efectos pro-oncogénicos en otros tumores como en los de colon, de recto, de ovario y de útero, donde se ha visto sobreexpresado (Lo *et al.*, 2006).

Además de implicaciones en tumores, dados los marcados efectos de Spry en organogénesis, es posible que tenga un importante papel en distintas enfermedades congénitas. La mayoría de los ratones knock-out (KO) para mSpry2, no llegan a nacer y la esperanza de vida de los que lo hacen es de unos días (Shim *et al.*, 2005a; Taketomi *et al.*, 2005), además de presentar distintas malformaciones: sordera congénita, debido a la incorrecta cito-arquitectura del órgano de Corti, y acalasia esofágica, con los trastornos digestivos asociados con ella.

4. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

La familia de factores de transcripción NF- κ B es activada por un amplio abanico de estímulos y regula cientos de genes en procesos fisiológicos y patológicos (Mattson y Meffert, 2006; Bassères y Baldwin, 2006). NF- κ B consta, en mamíferos, de cinco miembros: c-Rel (Rel), p65 (RelA), RelB, p50 (NF- κ B1) y p52 (NF- κ B2), siendo estos dos últimos procesados proteolíticamente a partir de p105 y p100 respectivamente (Hoffmann *et al.*, 2006). Los miembros de NF- κ B se asocian formando homo- o hetero-dímeros, siendo la pareja más estudiada la de p65/p50 (Ghosh y Karin, 2002). Según el modelo clásico, en células no estimuladas, los dímeros NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma por los inhibidores de NF- κ B (I κ Bs), aunque nuevos datos indican que el complejo p50:p65:I κ B α recircula entre citoplasma y núcleo constantemente (Johnson *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). La familia de I κ Bs incluye a las proteínas I κ B- α , - β , - γ , - ε , Bcl-3 y, los precursores de p50 y p52, p105 y p100. Bcl-3 se engloba dentro de la familia de I κ Bs por analogía estructural, pero se diferencia en que es mayoritariamente una

proteína nuclear y en que posee dominios de transactivación (Bours *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1993).

Cuando las células se estimulan, I κ B se fosforila en serina y es ubiquitinado para su posterior degradación proteasomal, NF- κ B queda libre y se transloca al núcleo donde se une a los sitios κ B en los promotores de los genes diana. c-Rel, p65 y RelB cuentan en su estructura con dominios de transactivación imprescindibles para promover la transcripción génica. p50 y p52 no poseen dominios de transactivación, por lo que los dímeros formados con p50 y p52 se comportan como inhibidores de la activación de NF- κ B, ya que bloquean la unión de los dímeros transcripcionalmente activos a los promotores correspondientes (Franzoso *et al.*, 1992 y 1993). No obstante, en situaciones que parecen más excepcionales, pueden funcionar como activadores si Bcl-3 se encuentra unido a ellos, puesto que Bcl-3 proporciona el dominio de transactivación (Bours *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1993; Westerheide *et al.*, 2001).

Dentro del contexto del modelo clásico o canónico, la quinasa responsable de la fosforilación de I κ B es IKK (I κ B quinasa). IKK es un complejo formado por dos subunidades catalíticas llamadas IKK α /1 e IKK β /2, una subunidad reguladora llamada NEMO/IKK γ y un conjunto de proteínas, como chaperonas, con una función no totalmente definida hasta ahora (Mercurio *et al.*, 1997; DiDonato *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998; Rothwarf *et al.*, 1998). El mecanismo de activación de IKK no se conoce completamente, pero se han propuesto cambios conformacionales inducidos por interacciones proteína-proteína, fosforilaciones de IKK quinasas, autofosforilaciones inducidas por oligomerización y ubiquitinaciones no destructivas vías lisina-63 (Perkins, 2006 y 2007; Scheidereit, 2006). El mecanismo y las proteínas involucradas parecen ser dependientes del estímulo.

Existen otros muchos niveles de regulación de la actividad de NF- κ B. La fosforilación de p65, y del resto de proteínas NF- κ B, por quinasas citoplasmáticas y nucleares de diverso tipo, modula desde la afinidad de I κ B α por p65 (Sasaki *et al.*, 2005), hasta el reclutamiento de factores necesarios para la transcripción, como la ARN polimerasa II y co-activadores como p300 y CBP (Zhong *et al.*, 2002). Otros grados de regulación consisten en la acetilación (Ashburner *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001), secuestro en regiones sub-nucleares de las proteínas NF- κ B (Stark *et al.*, 2005), intercambio de dímeros en los promotores (Sacconi *et al.*, 2003), distinta afinidad por el promotor de un gen específico de los dímeros NF- κ B y reclutamiento de proteínas distintas al promotor dependiendo de la pareja de NF- κ B (Hoffmann *et al.*, 2003). Además, puesto que los estímulos que activan NF- κ B, simultáneamente activan otras vías de transducción de señales como las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la transcripción génica está finalmente controlada por la

integración de distintos factores de transcripción y de los co-activadores y co-represores que entre ellos reclutan (Natoli y De Santa, 2006).

Existe una llamada vía no canónica de activación de NF- κ B que, en principio, es activada por un menor número de estímulos (Scheidereit, 2006). En esta vía, la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) fosforila y activa a IKK α , la cuál independientemente de IKK β y NEMO, pero cooperando con NIK, fosforila a p100 permitiendo su procesamiento proteolítico hasta su forma madura p52. El dímero p52-RelB se transloca al núcleo y promueve la transcripción génica (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Las vías canónica y no canónica no actúan de forma independiente sino que están interrelacionadas.

Recientemente se ha descrito que el EGF es capaz de promover la fosforilación en tirosina de I κ B α lo que, independientemente de su ubiquitinación, permite la activación de NF- κ B (Sethi *et al.*, 2007). Se han descrito otros estímulos, como el H₂O₂, capaces de inducir la fosforilación de I κ B α en tirosina (Takada *et al.*, 2003).

4a. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) además de una citoquina pro-inflamatoria esencial en la defensa inmunitaria (Ehlers, 2003), está involucrada en proliferación celular y diferenciación (Nakane *et al.*, 1988; Castaños-Vélez *et al.*, 1998). TNF α es una proteína transmembrana de tipo II dispuesta en homo-trímeros (Kriegler *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1996). Su forma soluble es liberada al medio por el corte proteolítico de la metalo-proteasa TACE/ADAM-17 (Black *et al.*, 1997). TNF α es secretado de forma masiva por macrófagos activados pero también por células endoteliales (Freyer *et al.*, 1999), tejido muscular (Bergman *et al.*, 1999), adiposo (Bulló *et al.*, 2002), neuronal (Albensi *et al.*, 2000), fibroblastos, queratinocitos (Werth *et al.*, 2003), etc.

TNF α se une a dos receptores transmembrana: TNFRI (p55) y TNFRII (p75). Los TNFRs forman trímeros cuando están activados por la unión a su ligando (Banner *et al.*, 1993). El TNFRII tiene una distribución restringida a células del sistema inmune y endoteliales, por el contrario, la ausencia del TNFRI no está descrita en ningún tipo celular (Aggarwal, 2003), de ahí que en la literatura haya menos información sobre el TNFRII y que en esta introducción se haga hincapié en la señalización a través del TNFRI. TNFRI posee en su región citoplasmática un dominio de muerte (DD) (Tartaglia *et al.*, 1993) a través del cuál establece interacciones con los DDs de otras proteínas como la proteína silenciadora de DD (SODD) (Jiang *et al.*, 1999). Tras la unión de TNF α a TNFRI, TRADD (proteína con DD Asociada a TNFRI) desplaza a SODD y recluta entre otras proteínas a TRAF2 (Factor Asociado a TNFRI) y RIP1 (Proteína que Interacciona con el Receptor), formándose el Complejo I que media la activación de NF- κ B y de MAPKs (Hsu *et al.*, 1995, 1996 a y b).

TRADD, TRAF2 y RIP1 reclutan a FADD (DD asociado a FAS) y a la pro-caspasa 8 para formar el Complejo II e iniciar la vía apoptótica (Figura 5, Micheau y Tschopp, 2003; Schneider-Brachert *et al.*, 2004 y 2006; Pober *et al.*, 2005). En general, la activación de caspasas y una activación sostenida de JNK lleva a la apoptosis celular, mientras que la activación de NF- κ B promueve la supervivencia, ya que induce la expresión de proteínas antiapoptóticas que inhiben la vía de las caspasas y de JNK (Dutta *et al.*, 2006; Wajant *et al.*, 2003; Papa *et al.*, 2004; Wullaert *et al.*, 2006).

4b. COMPLEJO I: EL PAPEL DE TRAF2 Y DE LA UBIQUITINA

La ubiquitinación es uno de los principales modos de control de la vía de NF- κ B. La ubiquitinación es un proceso que ocurre en tres pasos, primero una enzima activante de la ubiquitina (E1) forma un enlace tioéster de alta energía con la cisteína C-terminal de la ubiquitina, después la ubiquitina es transferida a la enzima conjugante E2 y finalmente, la enzima E3 o bien transfiere la ubiquitina, o bien lo facilita, desde la E2 hasta la lisina de la proteína diana, formando un enlace isopeptídico (Chen, 2005; Krappmann y Scheidereit, 2005). La ubiquitina posee siete residuos de lisina por los que puede formar cadenas de poliubiquitinas. Las cadenas de poliubiquitinas formadas a partir de las lisinas 48 (Ub-Lis48) y 63 (Ub-Lis63) son las más caracterizadas y parecen tener distintas funciones, estando la primera relacionada con la degradación de la proteínas por la vía proteasomal y, la segunda, con el ensamblaje y activación de complejos proteicos (Sun y Chen, 2004).

TRAF2 y TRAF6, actúan como ubiquitina ligasas gracias a su RING finger, que junto con el complejo E2 dimérico Ubc13/Uev1A, promueven la ubiquitinación a través de Ub-Lis-63 (Deng *et al.*, 2000; Habelhah *et al.*, 2004; Shi y Kehrl, 2003). Tras la unión de TNF α a TNFRI, se reclutan hasta el receptor a TRADD, TRAF2 y RIP1 (Hsu *et al.*, 1996a y b); TRAF2 y RIP1 se ubiquitinan por cadenas de Ub-Lis-63 y TRAF2 parece el encargado de mediar la ubiquitinación de RIP1 (Micheau y Tschopp, 2003; Zhang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004). Las cadenas de Ub-Lis-63 de RIP1 sirven de anclaje para las proteínas TAB (Figura 5; Kanayama *et al.*, 2004), subunidades reguladoras del complejo que contiene a la quinasa TAK1 que es capaz de fosforilar y activar a IKK (Wang *et al.*, 2001). Por otro lado, NEMO también reconoce esta cadena de ubiquitinas a través de un dominio específico (Ea *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). TRAF2 interacciona, a través de su RING finger, con las cremalleras de leucina de IKK α e IKK β (Devin *et al.*, 2001) y, aunque RIP1 es una serina-treonina quinasa, parece que su actividad quinasa es prescindible para la activación de IKK (Devin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004).

Aunque los MEFs KO para TAK1 tienen severamente afectada la activación de NF- κ B por

TNF α (Shim *et al.*, 2005b), ésta no lo está totalmente, así que otras serina-treonina quinasas pueden suplir en parte a TAK1 o, alternativamente, la quinasa involucrada en la activación de IKK es específica del tipo celular (Adhikari *et al.*, 2007). Otro candidato es MEKK3, que interacciona directamente con RIP1 y cuyos MEFs KO también presentan una importante disminución en la activación de NF- κ B (Yang *et al.*, 2001). Otras quinasas propuestas son MEKK1, que interacciona con RIP1 y con TRAF2 (Kim *et al.*, 2001; Baud *et al.*, 1999) o casein-quinasa1 α que también interacciona con RIP1 (CSK1 α ; Wang *et al.*, 2008). Diversas quinasas pueden modular la actividad de IKK, como Src que fosforila en dos tirosinas a IKK β (Huang *et al.*, 2003a y 2003b).

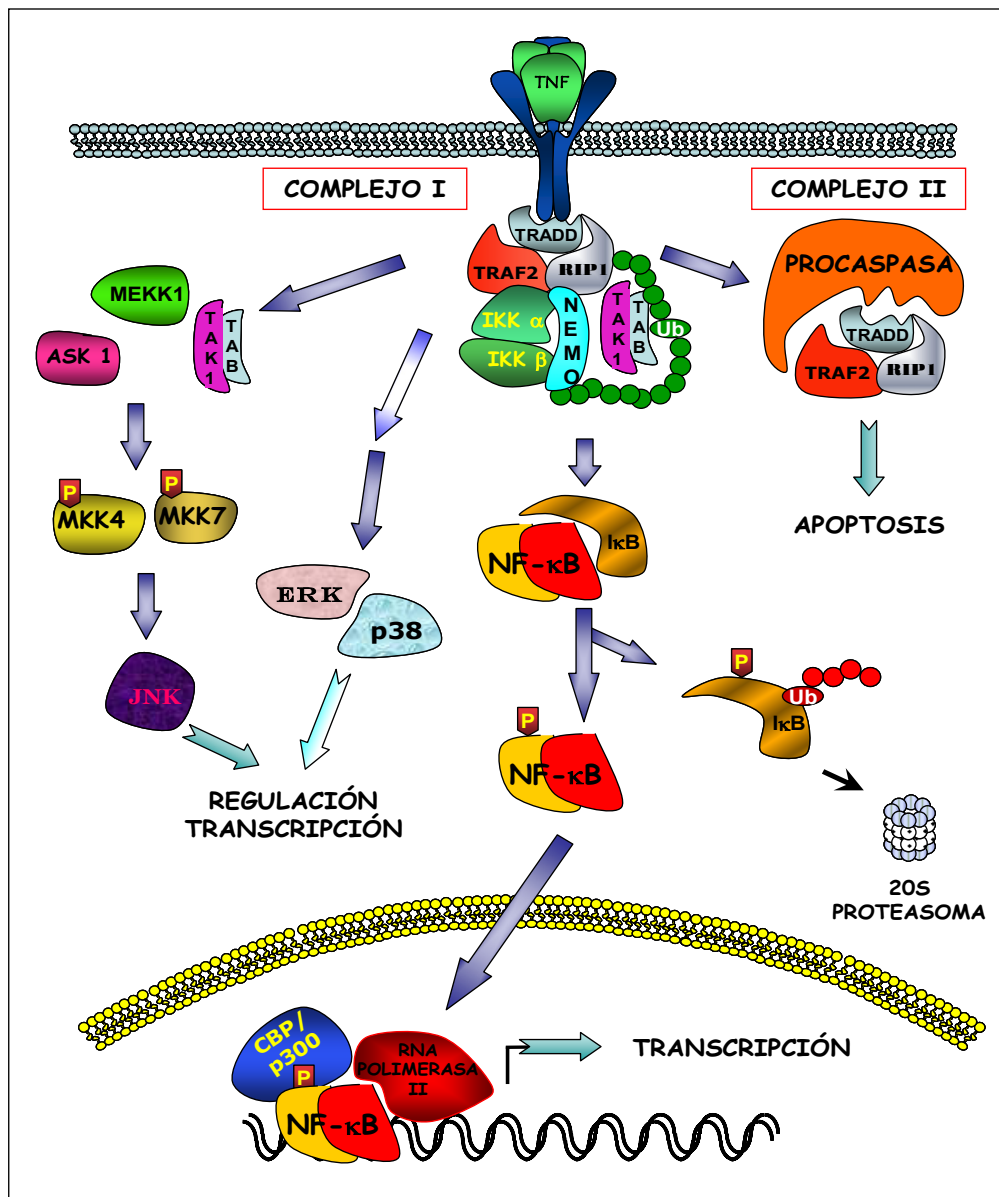


Figura 5. Vías de activación de TNF α . Tras la unión de TNF α a TNFRI este adopta una conformación activa. Se ensambla el complejo I que da lugar a la activación de NF- κ B y de las MAPKs. Por otro lado, y de forma más tardía, se forma en el citoplasma o en endosomas el complejo II. Las ubiquitininas degradativas están señaladas en rojo y las no-degradativas en verde.

En mamíferos se han descrito seis proteínas “canónicas” de la familia TRAF (Chung *et al.*, 2007). Todas tienen en común una región C-terminal característica denominada dominio TRAF (Rothe *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995). En su extremo N-terminal todas, a excepción de TRAF1, tienen un dominio RING finger y varios Zn-fingers. TRAF2 es una proteína de 56 kDa identificada por primera vez en estudios de doble-híbrido para detectar proteínas que se uniesen al extremo citoplasmático de TNFR1 (Rothe *et al.*, 1994). La mitad de los ratones KO para TRAF2 no sobreviven más allá del día E14.5 de gestación. Los que sobreviven presentan un fenotipo normal al nacer pero tienen un crecimiento retardado, una reducción de masa muscular y de depósitos de grasa, tienen atrofiado el bazo y el timo, y mueren a las dos semanas de nacer (Yeh *et al.*, 1997). En los MEFs de estos ratones, la activación de JNK por TNF α está impedida, pero la unión de NF- κ B, por ensayos EMSA, no está afectada probablemente, porque TRAF5 puede asumir el papel de TRAF2 en la activación NF- κ B por TNF α (Tada *et al.*, 2001).

4c. MAPKs Y TNF α

TNF α activa a las MAPKs p38, ERK y JNK (Karin, 1998; Davis, 1999; Liu y Han 2001) dependiendo del tipo celular (Rao, 2001), siendo la vía de JNK la más estudiada. TNF α activa a JNK por dos mecanismos, uno dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de ASK1 (quinasa reguladora de la apoptosis), el otro de MEKK1. En células quiescentes, ASK1 se encuentra secuestrada por la tiorredoxina (Trx). Trx es una proteína con dos cisteínas que funcionan como un sensor del estado redox, Trx “reducida” secuestra ASK1 (Saitoh *et al.*, 1998), pero tras la estimulación por TNF α , se producen ROS que “oxidan” a Trx liberándose ASK1. La proteína ASK1 puede entonces interactuar con TRAF2 (Liu *et al.*, 2000; Fujino *et al.*, 2007) y mediar la activación de JNK y de p38, ya que fosforila a MKK4 y MKK6 (Ichijo *et al.*, 1997). Por otro lado, TRAF2 interactúa directamente con MEKK1 (Baud *et al.*, 1999) y GCK (quinasa del centro germinal) y ambas entre sí (Chadee *et al.*, 2002). La estimulación por TNF α promueve la ubiquitinación por Ub-Lis-63 y oligomerización de TRAF2 y de GCK lo que facilita la oligomerización de MEKK1 y su activación por autofosforilación (Chadee *et al.*, 2002; Shi y Kehrl 2003; Habelhah *et al.*, 2004). MEKK1 activa a MKK4 y MKK7 que a su vez fosforilan a JNK (Moriguchi *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 2001). Otras proteínas esenciales para la activación de JNK, son RIP1, aunque su actividad quinasa sólo es necesaria para la activación de ERK (Devin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1996), y TAK1 cuyos MEFs KO no presentan activación de JNK por TNF α (Shim *et al.*, 2005b).

La activación de ERK por TNF α ha sido mucho menos estudiada, no obstante existen distintas vías propuestas. TNFR1 interactúa con Grb2 y Sos (Hildt y Oess, 1999) y esta

interacción parece mediar la activación de Raf-1 a través de Ras. Por otro lado, RIP2 es una proteína análoga a RIP1 que está presente en el complejo de TNFRI (McCarthy *et al.*, 1998), que interacciona con TRAF2 (Thome *et al.*, 1998) y que es capaz de activar a ERK por fosforilación directa (Navas *et al.*, 1999). Dentro de un contexto más canónico, TNFRI activa a la tirosín-quinasa Syk, que a su vez activa a la serín-treonín-quinasa Tpl2/Cot (Eliopoulos *et al.*, 2003 y 2006). Esta quinasa en colaboración con TRAF2 y RIP1, estarían mediando la activación de ERK1/ERK2.

La activación de las MAPKs regula la activación de NF- κ B. Por ejemplo, la quinasa MSK1 (quinasa regulada por estrés y mitógenos), que es activada por p38 y ERK, fosforila a p65 en un residuo importante para su actividad transcripcional además de fosforilar al coactivador transcripcional CBP y a la histona H3 (Vanden Berghe *et al.*, 1998; Gustin *et al.*, 2004; Vermeulen *et al.*, 2003; Haegeman *et al.*, 2003).

4d. NF- κ B EN CÁNCER

A finales del siglo XIX se conocía que el provocar infecciones agudas de piel mejoraba el pronóstico de algunos tumores (Coley, 1893). TNF α fue identificado originalmente como un factor que promovía la necrosis de células de fibrosarcoma de ratón L-929 (Carswell *et al.*, 1975). Hoy se sabe que, en determinadas circunstancias, NF- κ B puede actuar como un supresor tumoral (Perkins *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006), pero se ha observado una relación entre inflamación crónica e inicio tumoral (Clevers *et al.*, 2004; Coussens y Werb, 2002).

Una relación directa entre NF- κ B y cáncer se estableció por primera vez cuando se identificó a la proteína viral v-Rel como la causante de la leucemia aguda aviar (Gilmore, 1999). Muchos genes implicados en supervivencia, metástasis, inflamación, proliferación y angiogénesis, y por tanto relevantes en procesos tumorales son genes diana de NF- κ B (Bassères y Baldwin, 2006). Diversos genes de la vía de NF- κ B como p52, p65, Bcl-3, I κ B- α y TRAF2 están translocados, amplificados o mutados en linfomas, leucemias y mielomas humanos (Bargou *et al.*, 1997; Munzert *et al.*, 2004; Keats *et al.*, 2007; Kucharczak *et al.*, 2003). Por otro lado, diversos cánceres de mama, de melanoma y de pulmón, entre otros (Nakshatri *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2001; Ueda y Richmond 2007; Tang *et al.*, 2006), presentan una activación constitutiva de NF- κ B. La resistencia a quimioterapia y radioterapia de ciertos tumores parece estar relacionada con las propiedades anti-apoptóticas de NF- κ B y su activación como consecuencia del daño celular (Nakanishi y Toi, 2005).

5. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas (PGs) son compuestos de 20 carbonos formados a partir del ácido araquidónico (AA) liberado de fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Las PGs tienen en común un anillo de 5 carbonos pero difieren en los sustituyentes del anillo y de las cadenas laterales (Figura 6). Las ciclooxigenasas (COX1 y COX2) convierten el AA en PGH₂, que es a su vez transformado en los precursores de las diferentes familias de PGs por PG-sintasas específicas (Straus y Glass, 2001; Nosjean y Boutin, 2002).

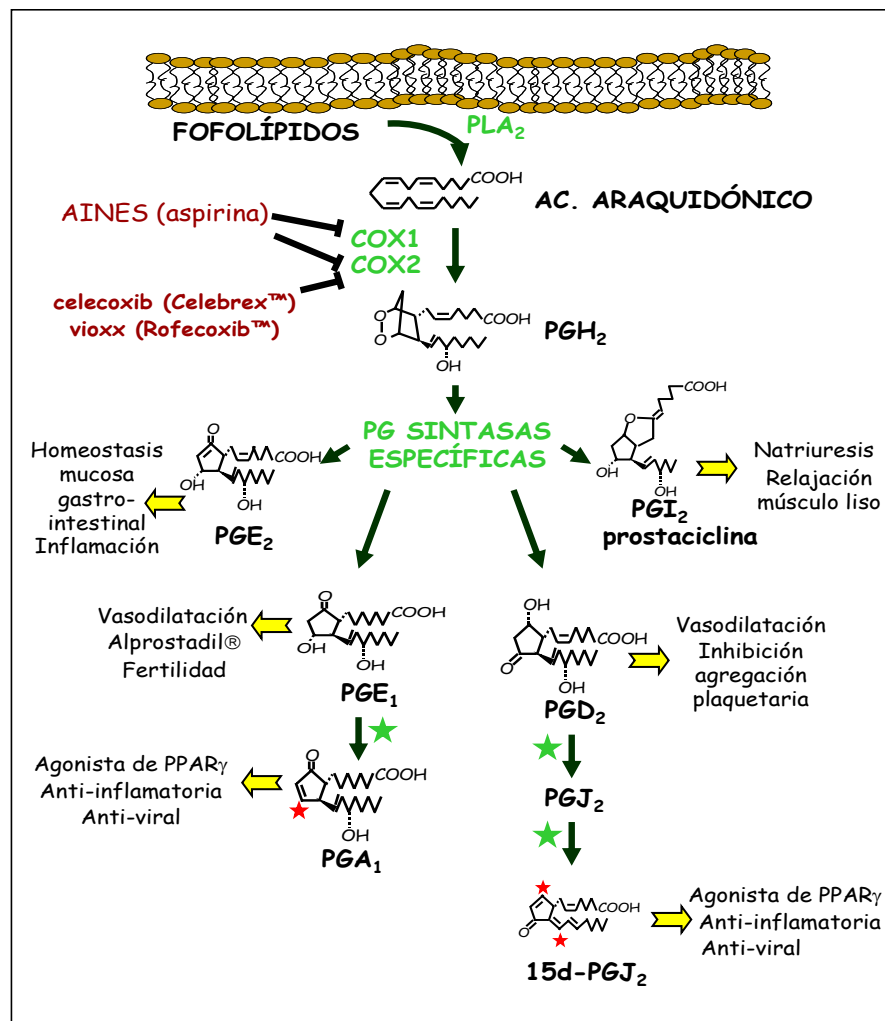


Figura 6. Ruta de síntesis de PGs y sus efectos. Síntesis del precursor común de todas las PGs, PGH₂, a partir del ácido araquidónico. Sobre PGH₂ actúan sintasas específicas para dar lugar a cada una de las familias de PGs. Las ciclopentenonas (PGA₁, PGJ₂ y 15d-PGJ₂) se producen por deshidratación espontánea (señalada por una estrella verde). Las estrellas rojas indican los carbonos β capaces de formar aductos de Michael. Los anti-inflamatorios no-esteroides (AINES) inhiben tanto a COX-1 como a COX-2, sin embargo existen ya inhibidores específicos de la isoforma 2.

Las PGs actúan de forma autocrina o paracrina por lo que se las suele denominar "hormonas locales" (Bos *et al.*, 2004; Funk, 2001). Normalmente, ejercen sus efectos a

través de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G-heterotriméricas. Las PGs tienen distintos efectos dependiendo del tipo y del subtipo de receptor celular. Estos efectos incluyen, entre otros muchos, la vasodilatación (Kumazawa *et al.*, 2007) y vasoconstricción (Arikawa *et al.*, 2006), la agregación plaquetaria (Rolin *et al.*, 2007), regulación del sistema inmune y de la inflamación (Kabashima *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2008), regulación de la homeostasis gastrointestinal (Hatazawa *et al.*, 2007), contracción uterina (Doheny *et al.*, 2007), regulación del sistema reproductivo (Khosrowbeygi *et al.*, 2007) y regulación de la temperatura corporal y del dolor (Lazarus *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2007).

5a. PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Las familias A y J son prostaglandinas atípicas puesto que no se unen a receptores transmembrana conocidos. Sin embargo la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) fue el primer ligando natural descrito del receptor nuclear “huérfano” PPAR γ (Receptor Activado por la Proliferación de Peroxisoma γ ; Forman *et al.*, 1995; Kliewer, *et al.*, 1995). PPAR γ , que a su vez es un factor de transcripción, interviene en el metabolismo lipídico (Mazid *et al.*, 2006) y glucosídico (Hevener *et al.*, 2007), en la diferenciación de adipocitos (Forman *et al.*, 1995; Kliewer, *et al.*, 1995) y en inflamación (Blanquart *et al.*, 2003).

Estructuralmente las familias A y J se diferencian en que son ciclopentenonas (cyPG), y no ciclopentanonas, ya que poseen un carbonilo α,β -insaturado en el anillo. Este carbono β es un centro electrofílico capaz de formar aductos de Michael con nucleófilos tales como los grupos SH de cisteínas (Figura 7). La 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) contiene dos de estos carbonos. Esta característica particular de las cyPGs es importante en su funcionalidad, puesto que su rango de efectos bioquímicos parece diferir de las PGs ciclopentanonas y puesto que sus efectos son simulados por la 2-ciclopenten-1-ona pero a concentraciones mucho mayores (Petrova *et al.*, 1999; Sánchez-Gómez *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1996; Straus *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado que la activación de PPAR γ por 15dPGJ₂ es dependiente de la formación de un aducto de Michael (Shiraki *et al.*, 2005).

Se ha descrito que 15dPGJ₂ forma aductos de Michael con proteínas importantes en la vía de señalización de NF- κ B como I κ B-quinasa (Castrillo *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000), las subunidades p65 (Straus *et al.*, 2000) y p50 (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001) y el factor de transcripción c-Jun (Pérez-Sala *et al.*, 2003). 15dPGJ₂ también se une covalentemente a proteínas involucradas en distintos procesos celulares como el factor de iniciación de la transducción eIF4A (Kim *et al.*, 2007b), a G-actina (Gayarre *et al.*, 2006; Aldini *et al.*, 2007), vimentina (Stamatakis *et al.*, 2006) y Keap1 (una proteína sensora del estrés

oxidativo; Oh *et al.*, 2008). 15dPGJ₂ está relacionada con la regulación de la inflamación, promoviendo su resolución ya que favorece la apoptosis de macrófagos (Hortelano *et al.*, 2000) e inhibe la vía de NF-κB (Castrillo *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000; Straus *et al.*, 2000, Cernuda-Morollón *et al.*, 2001).

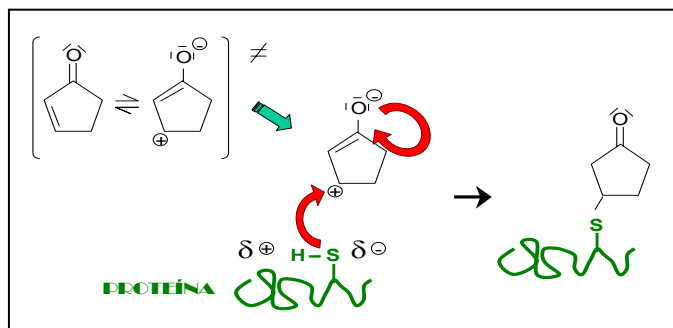


Figura 7. Formación del aducto de Michael. La forma resonante de la ciclopentenona aparece entre corchetes. El movimiento de los electrones en la reacción con la proteína se representa con flechas rojas.

Entre los efectos biológicos descritos para las cyPGs, los grupos de los doctores Pérez-Sala, Boscá y Rojas, han demostrado que 15dPGJ₂ se une y activa específicamente a H-Ras, lo que a su vez, conduce a la fosforilación y activación de ERK-1/2. Sin embargo, K y N-Ras ni unen 15dPGJ₂, ni son activados por ésta (Oliva *et al.*, 2003). La unión de 15dPGJ₂ a H-Ras se produce por la formación de un aducto de Michael con la cisteína 184 de H-Ras. Por otro lado, el tratamiento tópico de ratones con DMBA y TPA promueve la formación de papilomas (Balmain *et al.*, 1984), y la presencia de 15dPGJ₂ incrementa la tasa de formación, el tamaño y la vascularización de los mismos, ya que la activación de H-Ras por 15dPGJ₂ inhibe la apoptosis inducida por DMBA (Millán *et al.*, 2006).

PGA₁ es otra cyPG que actúa como un inhibidor de la vía de NF-κB ya que se une directamente a IKKβ (Rossi *et al.*, 2000) e interfiere en la unión de p50 al ADN (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001). PGA₁ ha suscitado mucho interés como antiviral, y de hecho hay estudios que han demostrado su efectividad contra el virus de la gripe (Conti *et al.*, 2001), el virus clásico de la fiebre porcina (Freitas *et al.*, 2003) y el VIH (Hayes *et al.*, 2002; Amici *et al.*, 2004). Los efectos inhibitorios de PGA₁ sobre la vía de NF-κB y sus propiedades antivirales parecen estar muy relacionados.

Muchos compuestos naturales usados en medicina tradicional, poseen en sus estructuras insaturaciones conjugadas con carbonilos (Tabla 1). La curcumina es el curcuminóide principal de una de las especias que forman el curry, la *Curcuma longa*, cuyas propiedades anti-inflamatorias y anti-tumorales parecen estar relacionadas, al menos en parte, por su capacidad de formar aductos de Michael (Marcu *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Pae *et al.*, 2007a y b). De hecho, la curcumina está siendo utilizada en ensayos clínicos en la actualidad (Hsu *et al.*, 2007). Por otro lado, la partenolida, que se extrae de *Tanacetum parthenium*, una planta de la familia de la margarita, tiene potentes efectos anti-tumorales

(Guzmán *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2007) e inhibe la vía de NF- κ B ya que se une directamente a IKK (Kwok *et al.*, 2001) y a p65 (García-Piñeres *et al.*, 2004 y 2001; Hewamana *et al.*, 2008). Por otro lado, las plantas poseen fitoprostano endógenos con estructuras similares a PGA₁ y a 15dPGJ₂ que se producen espontáneamente en el proceso de cocción de aceites vegetales, que poseen propiedades anti-inflamatorias en cultivos celulares (Karg *et al.*, 2007).

Recientemente (Homem de Bittencourt *et al.*, 2007), se han diseñado unos liposomas cargados con PGA₂, otra cyPG capaz de regular el metabolismo del colesterol de macrófagos activados (Senna *et al.*, 1998), que en modelos murinos consigue la recuperación de los daños vasculares causados por las placas de ateroma.

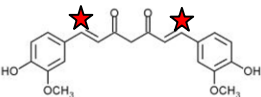
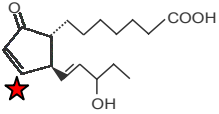
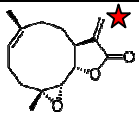
Nombre	Estructura	Origen	Efectos
Curcumina		<i>Curcuma longa</i>	Anti-tumoral, anti-inflamatorio (Pae <i>et al.</i> , 2007)
Fitoprostano ciclopentenonas		Aceite de oliva, nueces, soja	Anti-inflamatorio, pro-apoptótico (Karg <i>et al.</i> , 2007)
Partenolida		<i>Tanacetum parthenium</i>	Anti-tumoral, anti-inflamatorio (Guzmán <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 1. Compuestos naturales capaces de formar aductos de Michael. Nombre, estructura, origen y efectos de algunos compuestos naturales con actividad biológica capaces de formar aductos de Michael.

En este trabajo se ha analizado la unión entre la cyPG PGA₁ y H-Ras, y los efectos que dicha unión ejerce en la activación de H-Ras y ERK. Por otro lado, se ha estudiado si hSpry2 inhibe la activación de ERK inducida por PGA₁ y el mecanismo implicado. Asimismo, en el transcurso de estos estudios se observó que la sobreexpresión del mutante de hSpry2 en la tirosina 55 provocaba la activación transcripcional de NF- κ B, por lo que se decidió analizar este fenómeno con mayor profundidad, así como sus efectos en la vía del TNFR.

Objetivos



- I.** ESTUDIO DE LA UNIÓN DE LA PROSTAGLANDINA CICLOPENTENONA PGA_1 A LAS ISOFORMAS H-, N- Y K-RAS4B. ACTIVACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE RAS.

- II.** PAPEL DE LA PROTEÍNA hSPROUTY2 EN LA ACTIVACIÓN DE ERK MEDIADA POR PGA_1 .

- III.** EFECTOS DE LA PROTEÍNA hSPROUTY2 EN LA VÍA DE NF- κ B Y ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE DICHA PROTEÍNA CON OTRAS IMPLICADAS EN ESTA RUTA DE SEÑALIZACIÓN.

Materiales y Métodos



Tipos celulares. 293T, células embrionarias humanas de riñón con morfología epitelial, ATCC: CRL-1573. HeLa, células humanas de carcinoma de cérvix epitelial de Henrietta Lacks, ATCC: CCL-2. SW480, células humanas de adenocarcinoma epitelial de colon, ATCC: CCL-228; existen dos subpoblaciones descritas con morfología y respuesta hormonal distinta: SW480-ADH (adherentes) y SW480-R (redondeadas) (Pálmer *et al.*, 2001). COS1 y COS7, células de riñón de mono verde con morfología de fibroblasto, ATCC: CRL-1650 y CRL-1651 respectivamente. Todos los tipos celulares a excepción del SW480, fueron mantenidos en DMEM suplementado con 10 % FCS, 2 mM glutamina y 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (todo de Invitrogen). Las células SW480 fueron mantenidas en medio RPMI con los mismos suplementos. Cuando las células se privaron de suero, se utilizó el mismo medio en el que se crecen normalmente suplementado además con 10 mM pH 7,5 HEPES pero sin suero añadido.

Reactivos. Los reactivos para preparar los tampones fueron de Sigma y Merck. 15dPGJ₂ y PGA₁ de Cayman Chemical, FGF y EGF de Sigma-Aldrich, TNFα de Peprotech y la proteína recombinante H-Ras-wt humano de Calbiochem. La cantidad de proteína de los extractos celulares se cuantificó usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad).

Anticuerpos. anti-AU5 y anti-HA de Babco; anti-MAPK (ERK1) de NewEngland Biolabs; anti-TRAF2, anti-p65, anti-p50, anti-p52, anti-RelB, anti-IκBα de Santa Cruz; anti-Flag de SIGMA; anti-c-Cbl de BD Transduction Laboratories; anti-fosfo p44/p42 MAPK (ERK1/2) de Cell Signalling, anti-Spry, anti-Spry2 y anti-fosfotirosina de Upstate y los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP de Amersham.

Plásmidos. Los plásmidos pCEFL-KZ-HA, pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-K-Ras4B-wt (siempre que se hable de K-Ras, se estará haciendo referencia a esta isoforma), pCEFL-KZ-HA-N-Ras-wt, pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-C118S, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-C184S, pCEFL-KZ-HA-ERK1, pGEX-GST-Raf-RBD, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-wt, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-Y55F y pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-P59-304A ya han sido descritos (Rojas *et al.*, 1996 y 2000; Zarich *et al.*, 2000; Jorge *et al.*, 2002; Renedo *et al.*, 2007, Zohar *et al.*, 1998 y Taylor y Shalloway, 1996; de Álvaro *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007). Las secuencias codificantes de hSpry2 y sus mutantes con el epítipo HA, fueron sub-clonados en pCEFL-KZ-HA. Los plásmidos pCMV5-TRAF2, pCDNA-FLAG-

TRAF2 y pCMV5- Δ (6-86)-TRAF2 fueron gentilmente cedidos por el Dr. Stamatakis, y el plásmido pCMV-I κ B α -32-36 fue gentilmente cedido por la Dra. Ana Bigas.

Generación de mutantes. Los mutantes pCEFL-KZ-HA-hSpry2 P13A-Q16A-D20A (hSpry2-PQD) y pCEFL-KZ-HA-hSpry2 P13A-Q16A-D20A-Y55F (hSpry2-Y55F-PQD) se generaron por PCR con los oligos 5'-TCGCAG GCC TTG CTG GCG ACG CCC CGT GCC GGT GGC-3', 5'-GCG GGC CTG GCC TCT TTA CGG GTT ACG GGT TAT GGC CCT TG-3' y 5'-GGG CGC GTG GGG TAT GGG GGA TCT CGG GGT CGA CCA AGA AAGG-3'. Los fragmentos amplificados digeridos con BglII y NotI se ligaron en el vector pCEFL-KZ-HA digerido con BglII y NotI.

Transfecciones transitorias. Se realizaron con el agente de transfección JetPeI (Genycell) según el manual de usuario.

Transfecciones estables. Se generaron células SW480 y HeLa establemente transfectadas con pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-wt y pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-Y55F seleccionándolas con Neomicina. No se realizó selección clonal, sino que se utilizó el cultivo en masa.

Inmunoblot. Las proteínas se separaron por SDS/PAGE. Después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se incubaron con los anticuerpos correspondientes. Los inmunoblots se revelaron por electroquimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Inmunoprecipitaciones. Los extractos se generaron con buffer de lisis (25 mM pH 7,5 HEPES, 0,3 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 % Tritón, 20 mM β -glicerofosfato, 0,1 % SDS, 0,5% desoxicolato, con los inhibidores 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 2 μ g/ml leupeptina y 0,1 mM Na₃VO₄). Éstos se incubaron con 2 μ g del anticuerpo correspondiente durante 2 h, después con la resina GammaBindTMPlus (Amersham) al 50 % en buffer de lisis durante 1 h y luego se lavó tres veces en el buffer de lisis (Martínez *et al.*, 2007).

Co-inmunoprecipitaciones. Las inmunoprecipitaciones de proteínas con el epítipo HA se realizaron según el manual del usuario del kit μ MACs (Miltenyi Biotech). Las inmunoprecipitaciones, de las proteínas con otros epítopos se realizaron como se describe en el apartado anterior.

Análisis de la interacción entre cyPGs y H-Ras *in vitro*. La proteína H-Ras recombinante a una concentración final de 5 μ M se incubó en el buffer 20 mM pH 7,0 Tris-HCl, 45 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y 1,4 % glicerol. Las cyPGs fueron añadidas en DMSO a una concentración final de 50 μ M. Después de 2 h de incubación, las muestras se purificaron por ZipTip C18 antes o después de la digestión con tripsina a 37°C durante 4 h. El análisis por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF de la proteína H-Ras intacta y de los péptidos tripticos se realizó como

está descrito en Pérez-Sala, *et al.*, 2003. Para las proteínas intactas Ras, la matriz utilizada fue una solución saturada ácido sinapínico en acetonitrilo:agua (1:2) con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Debido a la diferencia substancial de masa entre la matriz (224 Da) y las cyPGs utilizadas (300 Da), la interferencia de los aductos matriz-cyPGs con los de Ras-cyPGs era despreciable. El estándar de calibración "Protein Calibration Standard II" (Bruker Daltonics) se usó para la calibración externa y las muestras se analizaron en modo lineal. Para el análisis de los péptidos tripticos la matriz se saturó con una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo:agua (2:1) con 0,1 % TFA, la muestra de calibración contenía angiotensina (m/z 1046,5), corticotropina (m/z 2465,2) y la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico m/z 379) y las muestras fueron analizadas en modo reflectrón. Los espectros fueron procesados en un BIFLEX III time-of-flight (Bruker-Franzen Analytik) operado en modo positivo. El análisis de EM-EM MALDI-TOF de las proteínas seleccionadas se realizó con un espectrómetro de masas MALDI-tandem time of flight 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) en la Unidad Proteómica del Parque Científico de Madrid. Los espectros se confirmaron rutinariamente cotejándolos con las bases de datos Mascot (Matrix Science, Londres) y BLAST. La probabilidad de los resultados basados en MOWSE, se calcularon como $-10 \times \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la concordancia obtenida sea un evento casual. Se consideraron significativos cuando $P < 0,05$.

Marcaje de H, K y N-Ras con PGA₁ biotinilada. El marcaje con biotina de cyPGs y la obtención de extractos celulares ha sido descrito previamente (Oliva *et al.*, 2003; Pérez-Sala *et al.*, 2003). Extractos celulares de células COS7, transfectadas o no con las isoformas de Ras, fueron incubadas con 30 μ M biotina-PGA₁ o 3 μ M biotina-15dPGJ₂ 2h en medio sin suero. Las células se lisaron en 50 mM pH 7,7 Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM 2-mercaptoetanol y 0,5 % SDS con 2 μ g/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina y 1,3 mM ABMSF. La incorporación de cyPGs biotiniladas se evaluó por inmunoblot con estreptavidina-HRP.

Ensayos de detección de Ras Activado. Estos ensayos ya han sido descritos previamente (Taylor y Shalloway, 1996). Brevemente, la proteína GST-Raf-RBD (Glutation-S-Transferasa-dominio de unión a Ras de la proteína Raf-1) se purificó con glutation-sepharosa (Amersham), a partir de extractos de la cepa *E. coli* BL21 (Hanahan, 1983) transformadas con el plásmido ya descrito (Zarich *et al.*, 2000; Taylor y Shalloway, 1996). Las células eucariotas usadas para el ensayo, después de ser privadas de suero durante 18 h fueron estimuladas con 100 ng/ml EGF, 25-50 ng/ml FGF, 3 μ M 15dPGJ₂ o 10 μ M PGA₁, en los tiempos indicados en las figuras. Las células se lisaron después en el tampón MLB: 25 mM pH 7,5 HEPES, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 1 mM PMSF, y 10 μ g/ml de leupeptina, aprotinina, pepstatin A e inhibidor de tripsina. Una alícuota de los sobrenadantes se guardó con buffer de Lammeli y el resto se incubó con 20 μ g de GST-Raf-RBD unida a la resina de glutation-sepharosa, durante 1 h/4°C. Tanto los sobrenadantes, así como los ensayos de detección de Ras-GTP se analizaron por inmunoblot.

Ensayos luciferasa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los ensayos de luciferasa se emplearon para medir la activación transcripcional de Elk-1 y NF- κ B.

Para medir la actividad transcripcional de Elk-1, las células se transfectaron con 0,67 ng del ADN de estudio, 35 ng de TATA-Gal4-Luc (gen reportero que contiene el gen que codifica para la enzima *Photinus luciferasa* bajo el control de Gal4), 16,6 ng de pcDNA3-Gal4-Elk1 (el plásmido que contiene el gen Gal4 con un promotor controlado por Elk-1) y 0,1 ng de pRL-TK (plásmido que expresa la enzima *Renilla luciferasa* bajo el control del promotor TK de HSV).

Para medir la actividad transcripcional de NF- κ B, las células se transfectaron con 0,67 ng del ADN de estudio, 0,35 μ g de 3-enh- κ B-Luc (descrito en Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1993, que contiene el gen de luciferasa bajo el control de tres copias consenso de κ B del subtipo κ de la cadena ligera de inmunoglobulina) y 0,1 ng de pRL-TK.

Los extractos celulares se generaron 5 h post-estimulación según el manual de instrucciones del "Dual-Luciferase Kit" (Promega). La luz emitida por las luciferasas *Photinus* y *Renilla* se midieron en el luminómetro OPTOCOMP 1 (MGM Instruments).

La actividad luciferasa *Renilla* presente en cada extracto se utilizó para la normalización de la señal de luciferasa, como una medida de la eficiencia de transfección.

Inmunofluorescencias. Las células se sembraron y se transfectaron sobre cubres circulares. Las células se fijaron en 4 % paraformaldehído durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron 3x5min con PBS tras este paso y entre todos los demás. Las células se permeabilizaron 10 min a temperatura ambiente (t/a) con 0,1 % Tritón-X100 en PBS. Se bloquearon 1 h/t.a. con 3 % BSA. Todos los anticuerpos se incubaron en 3 % BSA. Los anticuerpos primarios se incubaron 1 h/t.a. o 18 h a 4°C a una dilución 1/50, a excepción del anticuerpo anti-AU5-FITC (Covance) que se empleó a una dilución 1/500. El anticuerpo secundario Alexa-Fluor-647 cabra anti-ratón (Invitrogen) se incubó durante 1 h a una dilución 1/500. En el penúltimo lavado los cubres se incubaron con 1 μ g/ml DAPI (Calbiochem). Los cubres se montaron sobre los portas con Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen). Las inmuno-fluorescencias se analizaron en el Microscopio Laser Confocal Spectral (CLSM) Leica TCS SP2-AOBS (Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid).

Ensayos de retardo y súper-retardo en gel (EMSA).

Obtención de los lisados celulares. Las células estimuladas se lavaron, rasparon y recogieron en PBS frío, se centrifugaron 3 min a 6.500 rpm y se resuspendieron en el tampón A (50 mM NaCl, 10 mM pH 7,5 HEPES, 17 % sacarosa, 1 mM EDTA, 0,5 mM espermidina y 0,2 % Tritón X-100). Se mantuvieron 2 min en hielo y se centrifugaron 3 min 6.500 rpm. Los sobrenadantes se corresponden con la fracción citosólica. Los precipitados se resuspendieron en el tampón B (50 mM NaCl, 10 mM pH 7,5 HEPES, 50 % glicerol, 0,1 mM EDTA y 0,5 mM espermidina) y se centrifugaron de la misma manera. Los precipitados se resuspendieron en el tampón C (350 mM NaCl, 10 mM pH 7,5 HEPES,

25 % glicerol, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM espermidina y 0,2 % Tritón X-100), y tras incubarlos 1 h/4°C se centrifugaron 20 min a 6.500 rpm, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C. Los sobrenadantes se corresponden con los extractos nucleares. Todos los tampones contenían los inhibidores PMSF, aprotinina y 2-mercaptoetanol.

Marcaje del oligo. Como sonda de unión a NF-κB se utilizaron oligonucleótidos con el doble motivo consenso de unión a NF-κB tal y como se encuentra en el LTR del VIH (Bacheliere *et al.*, 1991):

5'-agcttacaa GGGAC TTTCC gct GGGGAC TTTCC aggga

atg tt CCCTG AAAGG cga CCCCT GAA AGG tccc ttcca -3'

25 ng de oligo se incubaron durante 15 min./37°C con 54 μCi de α³²P-dCTP (de Amersham o Hartmann Analytic) según el manual de instrucciones de Megaprime Labeling System (GE Healthcare). La sonda fue purificada con el "Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns Radiolabeled Probe Purification Kit" (GE Healthcare) y se cuantificó el marcaje del oligo en un contador de centelleo (Beckman LS6000LL).

Retardo. Entre 3 y 10 μg de proteína nuclear se incubaron con un volumen equivalente de buffer de incubación [0,5 mg/ml BSA, 0,17 mg/ml PolidIdC (SIGMA), 3 mM DTT, 17 mM KCl, 6,7 mM pH 7,5 HEPES, 0,3 mM EDTA y 1,7 % glicerol] y con 60.000-70.000 cpm de oligo marcado durante 30 min. Para los súper-retardos, se añadieron 0,3 μg anticuerpo/(μg de proteína) 15 min antes de la adición de la sonda. Para los ensayos de competición se preincubó con el oligo sin marcar a una concentración molar de 40x respecto al oligo marcado empleado. Después se añadieron 2 μl de buffer de carga de ADN y se corrió en un gel de acrilamida del 5 % en buffer TBE 1X. Películas fotográficas se expusieron con los geles durante 3-5 días a -80°C.

Análisis estadístico. Los valores se muestran como la media ± error estándar de al menos tres experimentos. La significación estadística se estimó con el test t de Student para dos muestras independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,5.

Resultados y Discusión



1. LA CICLOPENTENONA PGA₁ Y LAS ISOFORMAS DE RAS

Los grupos de los doctores Pérez-Sala, Boscá y Rojas, demostraron que la cyPG 15dPGJ₂ se une y activa específicamente a la isoforma H-Ras (Oliva *et al.*, 2003). El mutante H-Ras-C184S, que no une a la prostaglandina ni *in vivo*, ni *in vitro*, no se activa *in vivo* por 15dPGJ₂, aunque su activación es normal tras la estimulación por suero. Estos datos sugerían que la activación de H-Ras por 15dPGJ₂, dependía de la formación de un enlace covalente a través de una adición de Michael de 15dPGJ₂ en la cisteína 184 de H-Ras (Oliva *et al.*, 2003).

Posteriormente, en colaboración con el grupo de la Dra. Pérez-Sala, estudiamos, por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF, otras cyPGs que pudiesen formar aductos de Michael con H-Ras *in vitro* (Renedo *et al.*, 2007). De las cyPGs estudiadas, 15dPGJ₂ se incorpora a H-Ras con una razón m/z compatible con una única adición, lo que concuerda con los datos ya publicados (Oliva *et al.*, 2003), mientras que PGA₁ puede unirse a H-Ras con una estequiometría de 1:1, 2:1 o 3:1 (Renedo *et al.*, 2007; Figura 8A).

Para determinar qué residuos de H-Ras unían covalentemente PGA₁, se digirió con tripsina la proteína H-Ras modificada con PGA₁ y se analizaron los péptidos obtenidos por EM MALDI-TOF (Figura 8B). 15dPGJ₂ modifica a H-Ras principalmente en la región C-terminal, confirmando los datos publicados previamente (Oliva *et al.*, 2003) que muestran que la cisteína 184 de H-Ras es la diana de esta cyPG. La huella peptídica de H-Ras modificada por PGA₁ muestra distintos péptidos cuya razón masa/carga (m/z) es compatible con la presencia de aductos con PGA₁ (Figura 9A). Los sitios modificados corresponden a las cisteínas 181 y/o 184 de la región C-terminal y a la cisteína 118, localizada en el motivo G4 de unión de GTP/GDP. La abundancia de péptidos que presentan una única modificación por cyPGs, ya sea en la cisteína 118 o en las cisteínas 181 ó 184, o bien una doble modificación en las cisteínas 181 y 184, aparece representada en la Figura 9B. El péptido tríptico de H-Ras modificado más abundantemente por PGA₁, que presenta una relación m/z de 948,4, contiene a la cisteína 118. Estos resultados reflejan que el residuo de H-Ras que mayoritariamente participa en la formación de un aducto de Michael con una cyPG, depende del tipo de cyPG, así PGA₁ muestra una clara preferencia por la cisteína 118, mientras que 15dPGJ₂ es exclusiva de la cisteína 184.

El por qué de estas diferencias en la especificidad de PGA₁ y de 15dPGJ₂ por una u otra cisteína de H-Ras se desconoce. Recientemente se ha descrito la proteína PPAR_γ cristalizada con 15dPGJ₂ (Waku *et al.*, 2008), que confirman los resultados del modelo estructural entre

esta cyPG y PPAR γ (Shiraki *et al.*, 2005). En este caso, además de la formación de un aducto de Michael entre PPAR γ y 15dPGJ $_2$, se establecen contactos hidrofóbicos entre la proteína y las cadenas laterales de la cyPG.

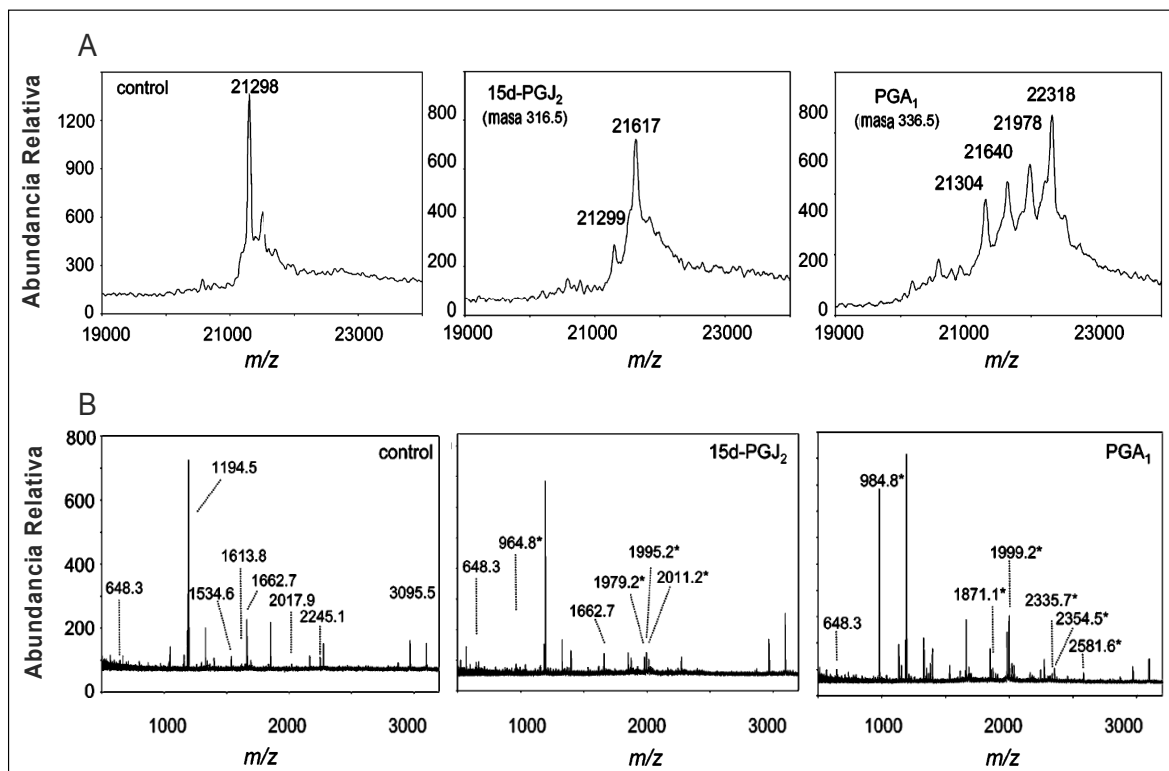


Figura 8. (A) Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de la interacción de las prostaglandinas ciclopentenonas 15dPGJ $_2$ y PGA $_1$ con la proteína H-Ras. La proteína recombinante H-Ras (5 μ M) se incubó 1 h a t.a. en presencia del vehículo (control; DMSO) o las cyPGs correspondientes (50 μ M). H-Ras, modificada o no, fue analizada por EM MALDI-TOF. Los espectros mostrados son representativos de al menos dos ensayos por condición. **(B) Análisis por EM MALDI-TOF de los péptidos trípticos de H-Ras modificado con PGA $_1$ y 15dPGJ $_2$.** La proteína H-Ras tratada como se indica en el apartado (A) fue digerida con tripsina y analizada por EM MALDI-TOF. Los valores mono-isotópicos m/z seleccionados de los péptidos detectados están indicados. La mayor parte de los péptidos modificados aparecen alrededor de 960-990 y/o 2.000 en el eje de las abscisas. Los péptidos que presuntamente están modificados aparecen señalados con asteriscos. Las huellas peptídicas son representativas de al menos dos ensayos por condición experimental.

Las estructuras de PGA $_1$ y de 15dPGJ $_2$ difieren (introducción Figura 6). Las conformaciones de las cadenas laterales de 15dPGJ $_2$ en comparación con PGA $_1$ son, en principio, más restringidas por la presencia de dos dobles enlaces adicionales en 15dPGJ $_2$, por lo que es posible que 15dPGJ $_2$ carezca de la flexibilidad necesaria para acceder hasta la cisteína 118. Por otro lado, PGA $_1$ posee un grupo hidroxilo en una de sus cadenas laterales que potencialmente puede formar puentes de hidrógeno. Es posible que PGA $_1$, por su estructura tridimensional y por poseer un sustituyente capaz de formar puentes de hidrógeno, pueda establecer un tipo de interacciones con el motivo de unión de GTP/GDP de H-Ras que 15dPGJ $_2$ no puede formar.

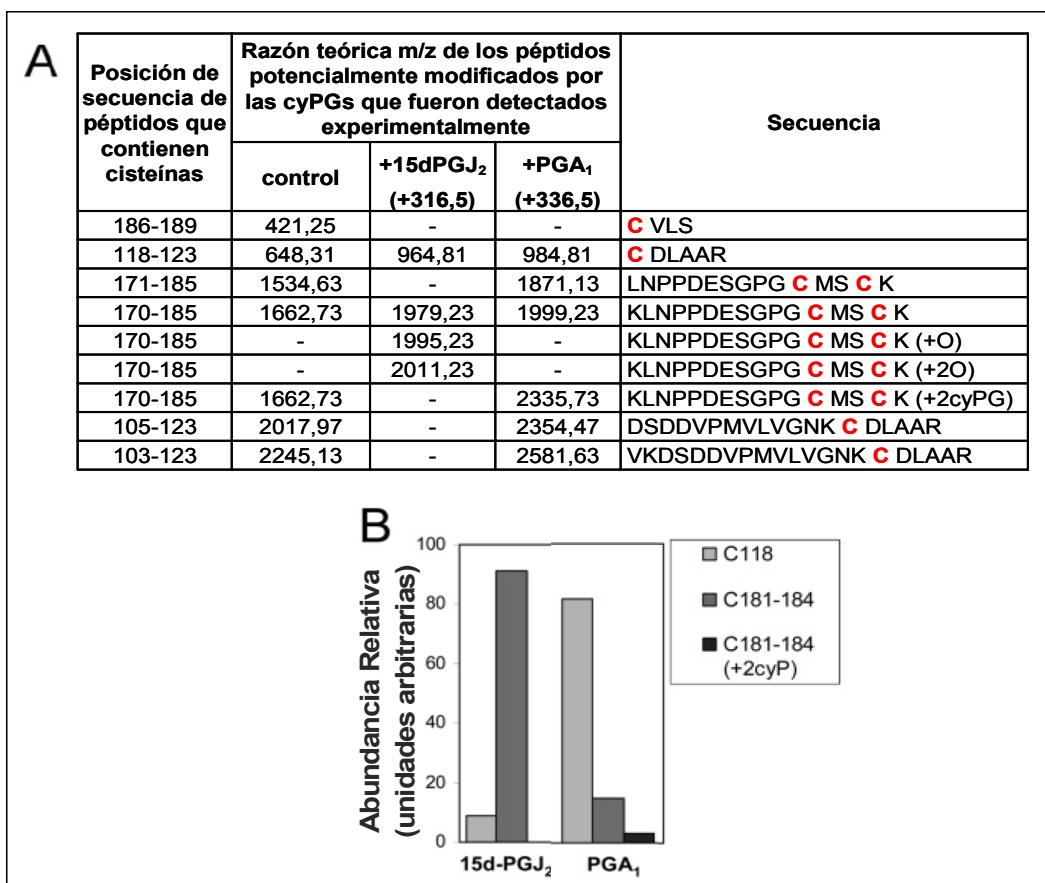


Figura 9. Modificación diferencial de las cisteínas de H-Ras por 15dPGJ₂ y PGA₁ *in vitro*. (A) Tabla en la que se presentan la razón m/z de los péptidos tripticos teóricos potencialmente modificados por las cyPGs que son compatibles con los picos obtenidos experimentalmente. También se describe su posición en la secuencia de H-Ras y la propia secuencia. Las cisteínas están resaltadas en rojo. +O: m/z compatible con la adición de oxígeno; +2cyPG: m/z compatible con la adición de dos cyPGs. (B) **Abundancia relativa de la modificación de las cisteínas indicadas para cada cyPG.** Los valores representan la suma de la intensidad de los picos modificados que contienen las cisteínas 118 ó 181-184 normalizados con la intensidad del péptido 3095,5 que no está modificado, están expresados en su valor porcentual para cada cyPG. Los resultados mostrados son los valores medios de al menos dos determinaciones. Intensidad de los picos compatibles con la unión de: una molécula de cyPG en la cisteína 118 [C118], una molécula de cyPG en la cisteína 181 ó 184 [C181-184], de dos moléculas de cyPG en las cisteínas 181 y 184 [C181-184 (+2cyP)].

1a. MODIFICACIÓN DE H-RAS POR 15dPGJ₂ Y PGA₁ BIOTINILADAS *IN VITRO*

Para estudiar si PGA₁ se une a H-Ras *in vivo* es necesario utilizar PGA₁ biotinilada. La biotina, que se une a PGA₁ y a 15dPGJ₂ a través de un linker que se une por el grupo carboxilo de las mismas formando un enlace amida, es estructuralmente voluminosa (Figura 10) por lo que es posible que afecte a las interacciones que PGA₁ establece con H-Ras. Por ello se estudió por EM-MALDI-TOF el espectro de unión de ambas cyPGs-biotiniladas a la proteína H-Ras recombinante. En el espectro de H-Ras tratado con biotina-15dPGJ₂ (Figura 10), además del pico esperado para H-Ras sin modificar, aparece un pico adicional compatible con la

modificación de H-Ras, al igual que ocurre en el espectro de H-Ras modificada con 15dPGJ₂ sin biotinar (Figura 8A). La misma coincidencia se da entre el espectro de H-Ras modificada con PGA₁ (Figura 8A) y el de H-Ras modificada con PGA₁ biotinilada (Figura 10). En ambos espectros aparecen, además del pico que corresponde a H-Ras sin modificar, tres picos adicionales compatibles con H-Ras unido a PGA₁ o biotina-PGA₁.

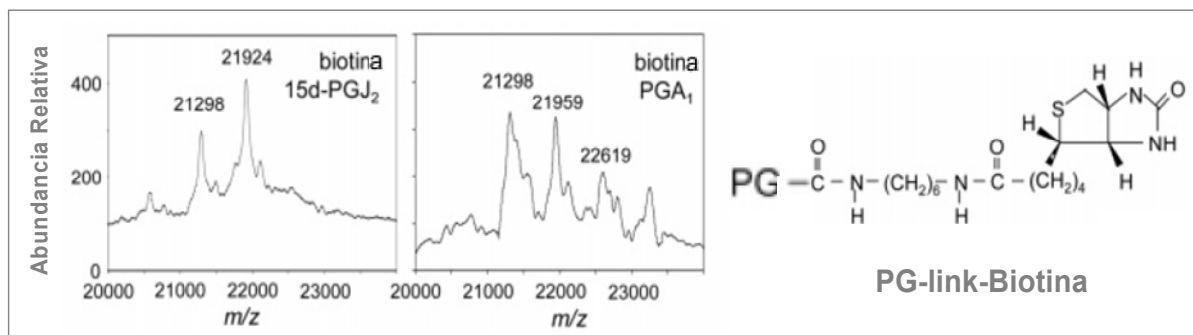


Figura 10. Modificación de la proteína H-Ras por PGA₁ y 15dPGJ₂ biotiniladas. Espectro de EM-MALDI-TOF de las proteína H-Ras incubadas con PGA₁ y 15dPGJ₂ biotiniladas y estructura de la biotina. La masa de la biotina-PGA₁ es de 626 y la de la biotina-15dPGJ₂ es de 661. Los espectros son representativos de al menos cuatro ensayos.

1b. PGA₁ MODIFICA A H-RAS *IN VIVO*

Se estudió si PGA₁, además de modificar a la proteína H-Ras recombinante *in vitro*, era capaz de modificar a H-Ras *in vivo*. Para ello, se transfectaron los plásmidos de H-Ras-wt y de los mutantes de H-Ras en las cisteínas 118 y 184 en células COS7. 24 h postransfección se incubaron con 15dPGJ₂ y PGA₁ biotiniladas y la presencia de H-Ras biotinilado se analizó por IB (Figura 11). Como se puede observar, la unión de biotina-15dPGJ₂ a H-Ras no está afectada por la mutación de la cisteína 118, pero se elimina casi completamente cuando se muta la cisteína 184, lo que concuerda con los datos obtenidos *in vitro* y con los resultados ya publicados (Oliva *et al.*, 2003). La unión de biotina-PGA₁ a H-Ras se reduce por la mutación de cualquiera de esas cisteínas. Es posible que el efecto de la mutación en la cisteína 118 de H-Ras en la unión de PGA₁ sea realmente más drástico que lo reflejado en estos datos, dada la menor capacidad de PGA₁ biotinilada de modificar a esta cisteína en comparación con PGA₁ sin biotinar (Figura 10 vs. Figura 8A).

Para que cualquiera de estas cyPGs pueda unirse a la cisteína 184 de H-Ras, esta cisteína debe estar despalmitoilada. La palmitoilación, al contrario que la farnesilación, es un proceso reversible (Magee *et al.*, 1987; Tsutsumi *et al.*, 2008). Los ciclos de despalmitoilación-palmitoilación de H-Ras regulan su distribución en membrana plasmática o Golgi (Rocks *et al.*, 2005; Goodwin *et al.*, 2005). La proteína H-Ras parece que se despalmitoíla en la membrana

plasmática y es transportada al Golgi/RE donde se repalmitoíla. En la bibliografía se describe que existe una población de H-Ras no unida a membrana, entre el 10 y el 50% según el estudio (Hancock *et al.*, 1990; Lu y Hofman, 1995), que probablemente se corresponde con la fracción no palmitoilada*. Aunque es posible que la adición de PGA_1 o de 15dPGJ_2 a las cisteínas 181 ó 184 altere la población H-Ras unida a membrana, la distribución de H-Ras en las fracciones P100 y S100 no cambia tras el tratamiento por estas cyPGs (datos no publicados Gayarre *et al.*). No obstante, sí es posible que PGA_1 o 15dPGJ_2 fueren una redistribución de Ras dentro de las endomembranas o incluso relocalice a H-Ras en microdominios de membrana. Por otro lado, la despalmitoilación de H-Ras es estimulada por agentes como los donantes de óxido nítrico (Mallis *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2000), así que tal vez estas cyPGs puedan también promover la despalmitoilación de Ras.

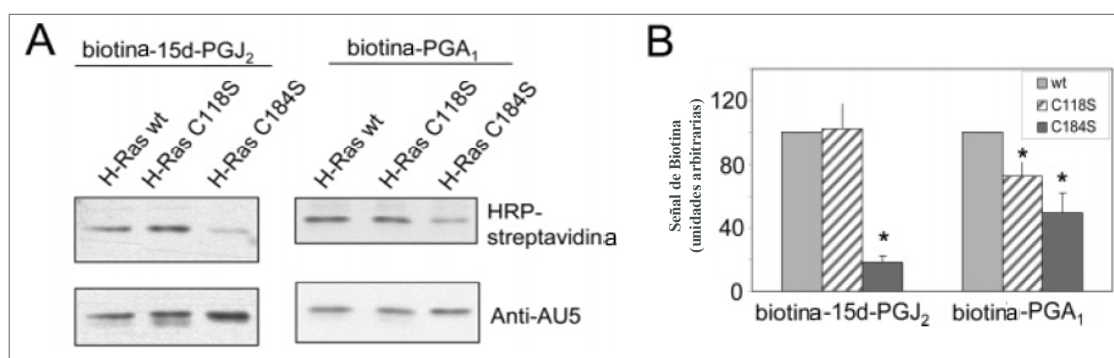


Figura 11. Modificación de H-Ras-wt y de los mutantes en las C118A y C184S por 15dPGJ₂ y PGA₁ biotiniladas *in vivo*. (A) Células COS7 fueron transfectadas con los plásmidos indicados y 24 h postransfección se incubaron con 3 μM biotina-15dPGJ₂ y 30 μM biotina-PGA₁. Los extractos fueron analizados por IB con estreptavidina-HRP. Las membranas se reincubaron con anticuerpo anti-AU5 para detectar la presencia de H-Ras. (B) Las imágenes escaneadas de las películas se usaron para cuantificar la intensidad de las bandas. Los ratios de las intensidades señal biotina/AU5 están representados como el porcentaje de los valores obtenidos para H-Ras-wt. Los valores son la media \pm error estándar de cuatro determinaciones (* $p < 0,05$ test-t vs H-Ras-wt).

Las cadenas de palmitato de H-Ras tienen una función que va más allá del mero anclaje de Ras a la membrana. La palmitoilación de la cisteína 181 está implicada en la correcta distribución de H-Ras entre la membrana plasmática y Golgi, mientras que la palmitoilación en la cisteína 184 es importante para la formación de agregados de H-Ras-GTP inmovilizados que interactúan con los efectores de Ras (Roy *et al.*, 2005; Rocks *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2007).

* Se desconoce si la fracción de Ras farnesilada y citosólica está libre o unida a alguna chaperona del tipo Rho-GDI, aunque sí existen varias proteínas candidatas para ejercer este papel (Wright y Philips, 2006). Además, está descrito el transporte de Ras farnesilado desde y hacia Golgi por mecanismos no vesiculares (Goodwin *et al.*, 2005).

1c. PGA_1 ACTIVA A H-RAS *IN VIVO*

Puesto que 15dPGJ₂ activa a H-Ras *in vivo* (Oliva *et al.*, 2003), era posible que PGA_1 también lo activara. Para comprobarlo, conjuntamente con Andrea Pérez Rodríguez, se transfectaron transitoriamente células HeLa con H-Ras-wt, H-Ras-C118A y H-Ras-C184A. Tras 18 h privadas de suero se estimularon con EGF, 15dPGJ₂ o PGA_1 y se evaluó H-Ras activo mediante ensayos de precipitación con la proteína GST-Raf-RBD (ver Materiales y Métodos). Como se puede apreciar (Figura 12), ambas cyPGs activan a H-Ras-wt pero difieren en su capacidad de activar a los mutantes de H-Ras. La activación de H-Ras por 15dPGJ₂ no está afectada por la mutación en la cisteína 118, pero desaparece completamente con la mutación de la cisteína 184. Sin embargo, la activación por PGA_1 del mutante H-Ras-C118A disminuye claramente, mientras que la activación del mutante H-Ras-C184A es similar a la de la proteína silvestre. La activación de ambos mutantes de H-Ras inducida por EGF es comparable a la de la versión silvestre, por lo que la incapacidad de estos mutantes de activarse por las cyPGs no es debida a una pérdida de la funcionalidad de los mismos causada por las mutaciones.

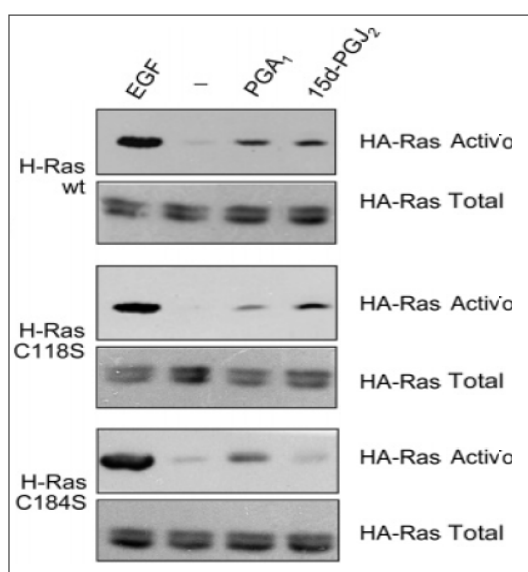


Figura 12. Activación de H-Ras wt y de los mutantes en las C118S y C184S por 15dPGJ₂ y PGA_1 *in vivo*. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos indicados. Después de 18 h privadas de suero, fueron tratadas con vehículo (-; DMSO), 100 nM EGF, 3 μ M 15dPGJ₂ o 10 μ M PGA_1 durante 15 minutos. La fracción de Ras-GTP (activo) fue precipitada usando GST-Raf-RBD y analizados por IB con anticuerpo anti-HA (paneles superiores). Los niveles de expresión fueron evaluados a partir de extractos celulares por IB usando anticuerpo anti-HA (paneles inferiores). Resultados similares fueron obtenidos en cuatro ensayos independientes.

Los datos obtenidos indican que la cisteína 184 de H-Ras es importante para la unión de 15dPGJ₂ y para la activación de H-Ras por esta cyPG, sin embargo es la cisteína 118 la implicada en la activación de H-Ras en el caso de PGA_1 , aunque dicha cyPG se una además a otras cisteínas. La cisteína 184 es exclusiva de H-Ras. N-Ras sólo presenta una cisteína palmitoilable en la región hipervariable, la cisteína 181, y K-Ras no se palmitoíla, lo que explica que la 15dPGJ₂ modifique a H-Ras únicamente. Por el contrario, la cisteína 118 es común a H-, N- y K-Ras, así que es posible que PGA_1 se una covalentemente y modifique a estas tres isoformas de Ras.

1d. PGA₁ TAMBIÉN ACTIVA A N-RAS Y K-RAS *IN VIVO*

Quisimos evaluar cuál era el comportamiento de N- y de K-Ras frente a PGA₁. Primero se comprobó que PGA₁ se unía a estas isoformas de Ras *in vivo*. Para ello, se transfectaron células COS7 con los plásmidos que codifican para las isoformas H-, N- y K-Ras, 24 h pos-transfección se incubaron con biotina-PGA₁ o biotina-15dPGJ₂ y los extractos celulares se analizaron por IB. Como se aprecia en la Figura 13A, 15dPGJ₂ se une preferentemente a H-Ras pero no a K-Ras, y hay una ligera unión de 15dPGJ₂ a N-Ras. Es posible que, en la ausencia de una cisteína en la posición 184, como ocurre en N-Ras, 15dPGJ₂ se pueda unir, aunque en menor medida a la cisteína 181. PGA₁, por su parte, se adiciona a las tres isoformas de Ras aunque la señal que se observa para K-Ras es menos intensa, lo que es compatible con un menor número de cisteínas modificables en esta isoforma dado que carece de ellas en la región C-terminal hipervariable.

A continuación, se quiso comprobar si PGA₁, además de unirse a estas isoformas de Ras, era capaz de activarlas. Para ello, conjuntamente con Andrea Pérez Rodríguez, se transfectaron células HeLa con los plásmidos correspondientes y se evaluó la activación de Ras. Como se aprecia en la Figura 13B, PGA₁ activa a las tres isoformas, y si extrapolamos los datos obtenidos para H-Ras por EM MALDI-TOF a N- y K-Ras, probablemente sea por la formación de un aducto de Michael con la cisteína 118 de las tres isoformas.

Se desconoce cómo PGA₁ es capaz de activar a Ras. La activación de H-Ras por 15dPGJ₂ es dependiente de un Ras-GEF (Oliva, 2002, Tesis Doctoral). Puede ser que éste sea el caso de PGA₁ o que, por el contrario, pueda actuar como un Ras-GEF *per se*. La cisteína 118 está localizada en el motivo G4 de interacción con los nucleótidos de guanina (Figura 2). Podría ocurrir que PGA₁ fuese capaz de desestabilizar la unión Ras-GDP favoreciendo la entrada y unión de GTP, tal como hace el óxido nítrico al unirse a la cisteína 118 de H-Ras (Lander *et al.*, 1995 y 1997; Mott *et al.*, 1997), o que incluso, su unión a la cisteína produzca un cambio conformacional en la proteína que mimetice a Ras unido a GTP.

PGA₁ también es capaz de unirse a las cisteínas dianas de palmitoilación de H-Ras. Los palmitatos de H-Ras establecen interacciones distintas con los fosfolípidos de las bicapas lipídicas dependiendo de si Ras está unido a GTP o GDP (Gorfe *et al.*, 2007; Hancock, 2006). Existen diferencias estructurales entre el palmitato y las cyPGs 15dPGJ₂ y PGA₁: la longitud de las cadenas alifáticas laterales y la presencia de grupos polares y de un anillo en las cyPGs. El hecho de que 15dPGJ₂ y PGA₁ se unan a H-Ras por la cisteína 184, sugiere que la orientación de H-Ras respecto a la membrana plasmática, a los Ras-GEFs y a los efectores de Ras, será diferente según la modificación lipídica, por lo que es posible que ello pueda influir en la activación de Ras. En cualquier caso, las cyPGs suponen un nuevo estímulo y/o modulador de la activación de Ras, probablemente en condiciones de inflamación. Es posible que en presencia de otros activadores de Ras, PGA₁ o 15dPGJ₂ modulen más finamente la señalización de Ras.

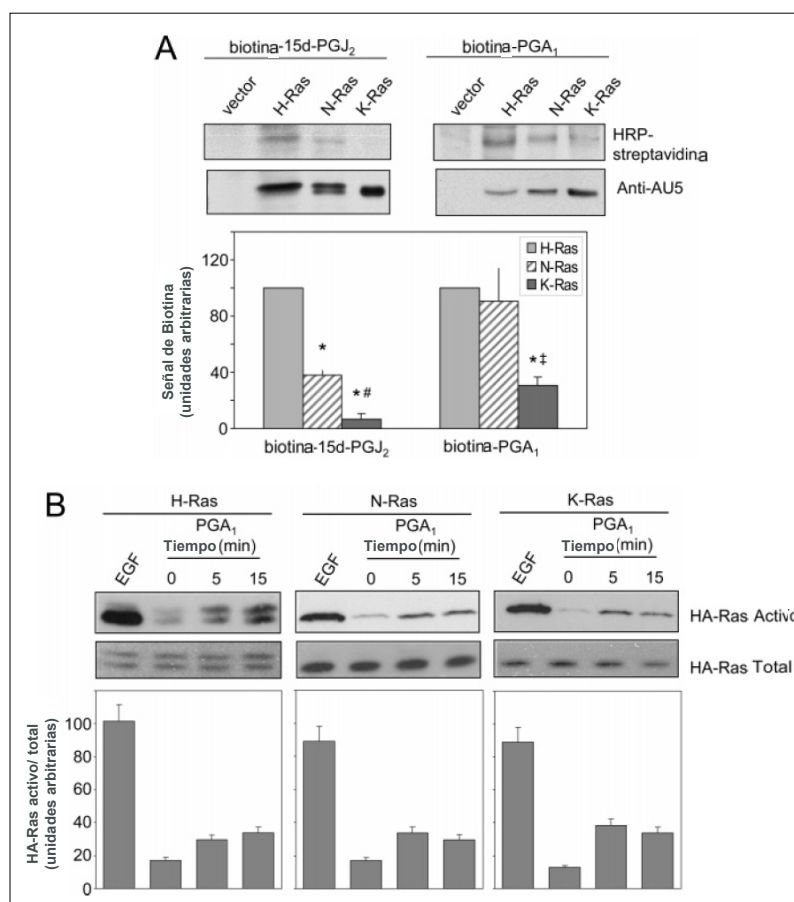


Figura 13. Modificación y activación de las proteínas H-, N- y K-Ras por 15dPGJ₂ y PGA₁. (A) Células COS7 se transfectaron con los plásmidos correspondientes y 24 h postransfección fueron incubadas con 3 μ M biotina-15dPGJ₂ o 30 μ M biotina-PGA₁. La incorporación de biotina a Ras se evaluó y cuantificó como se ha descrito. Los valores son la media \pm error estándar de tres ensayos en duplicado. [*p<0,05 vs H-Ras para cada cyPG biotinilada (test-t); #p<0,05 vs N-Ras-biotina-15dPGJ₂ (test-t); ‡p<0,05 vs K-Ras-biotina-15dPGJ₂ (test-t)]. (B) Células HeLa se transfectaron transitoriamente con los plásmidos indicados, se privaron de suero durante 18 h y fueron incubadas con 100 nM EGF durante 10 min o 10 μ M PGA₁ durante los tiempos indicados (el tiempo cero se corresponde con DMSO). Los niveles de Ras activados y de expresión de Ras se evaluaron como se ha descrito en la Figura 12. El experimento mostrado es representativo de tres ensayos independientes.

2. EFECTO DE SPROUTY SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ERK INDUCIDA POR LA CICLOPENTENONA PGA₁.

PGA₁, al igual que 15dPGJ₂ (Oliva *et al.*, 2003), además de activar a las proteínas Ras, induce la activación de ERK (Figura 14). Por otro lado, la proteína hSpry2 es un inhibidor de la activación de ERK inducida por determinados receptores tirosina-quinasa como el FGFR. Nos preguntamos si hSpry2 era capaz también de inhibir la activación de ERK estimulada por PGA₁,

un estímulo no ligado a receptores tirosina-quinasa.

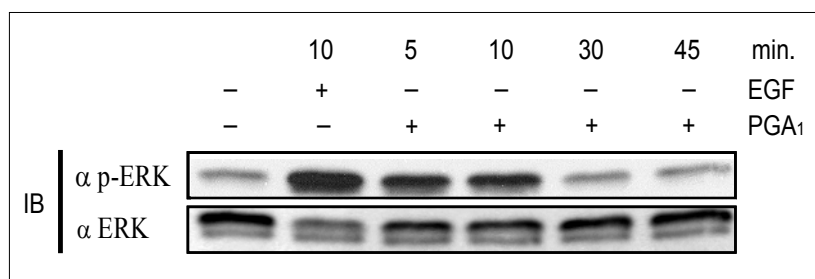


Figura 14. Activación de ERK-1/2 inducida por PGA₁. Células Cos1 se privaron de suero durante 18 h y fueron tratadas con vehículo (-; DMSO), 100 ng/ml EGF o 10 μ M PGA₁. Los extractos celulares se utilizaron para evaluar la fosforilación de ERK-1/2 endógeno por IB.

2a. hSPRY2 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ELK-1 INDUCIDA POR PGA₁

Como primera aproximación, evaluamos la activación promovida por PGA₁ del factor de transcripción Elk-1, una diana de ERK. Como se puede observar en la Figura 15A, hSpry2-wt y el mutante hSpry2-P59-304A inhiben la activación de Elk-1 inducida por PGA₁. El mutante de hSpry2 en las prolinas 59-304 no une Grb2, aunque sus propiedades inhibitorias en la ruta de FGFR permanecen intactas (Martínez *et al.*, 2007). Parece que la inhibición que hSpry2 ejerce sobre la activación de Elk-1 en respuesta a PGA₁, también es independiente de la unión de hSpry2 a Grb2. Ésta es la primera vez que se describe que hSpry2 inhibe la activación de Elk-1, para un estímulo no dependiente de receptores tirosina-quinasa.

El mutante hSpry2-Y55F (Y55F) se comporta como un dominante negativo de hSpry2 (Sasaki *et al.*, 2001). Este mutante, además de no inhibir la activación de ERK inducida por FGF, tampoco lo hace cuando el estímulo es PGA₁. Por lo tanto, hSpry2-wt y sus mutantes Y55F y P59-304A tienen el mismo efecto sobre Elk-1 cuando el estímulo es FGF o PGA₁.

Puesto que el dominio Spry de hSpry2 es una región rica en cisteínas, es posible que sea capaz de formar aductos de Michael con PGA₁ y que ésta unión interfiera en las funciones normales de hSpry2. Aunque se intentó evaluar si PGA₁ se unía a hSpry2, los resultados obtenidos no fueron concluyentes (datos no mostrados). Para estudiar si PGA₁ afectaba a la capacidad inhibitoria de hSpry2 sobre la ruta ERK/Elk-1 inducida por FGF, se emplearon ensayos luciferasa con Elk-1, incubando las células con PGA₁ durante 30 minutos o 2 h antes de estimularlas con FGF. La Figura 15B muestra que PGA₁ no afecta a la inhibición que hSpry2 ejerce en esta vía.

Los efectos de hSpry2 sobre la activación de ERK inducida por 15dPGJ₂, también se intentaron valorar por ensayos luciferasa, no obstante, nuestros datos indicaron que, de acuerdo con lo ya publicado (Zhang *et al.*, 2003), esta cyPG inhibe la transcripción/expresión de renilla (datos no mostrados), por lo que los valores obtenidos no se pueden normalizar por el grado de transfección. PGA₁ muestra un comportamiento similar pero a concentraciones muy

superiores a las empleadas en estos ensayos.

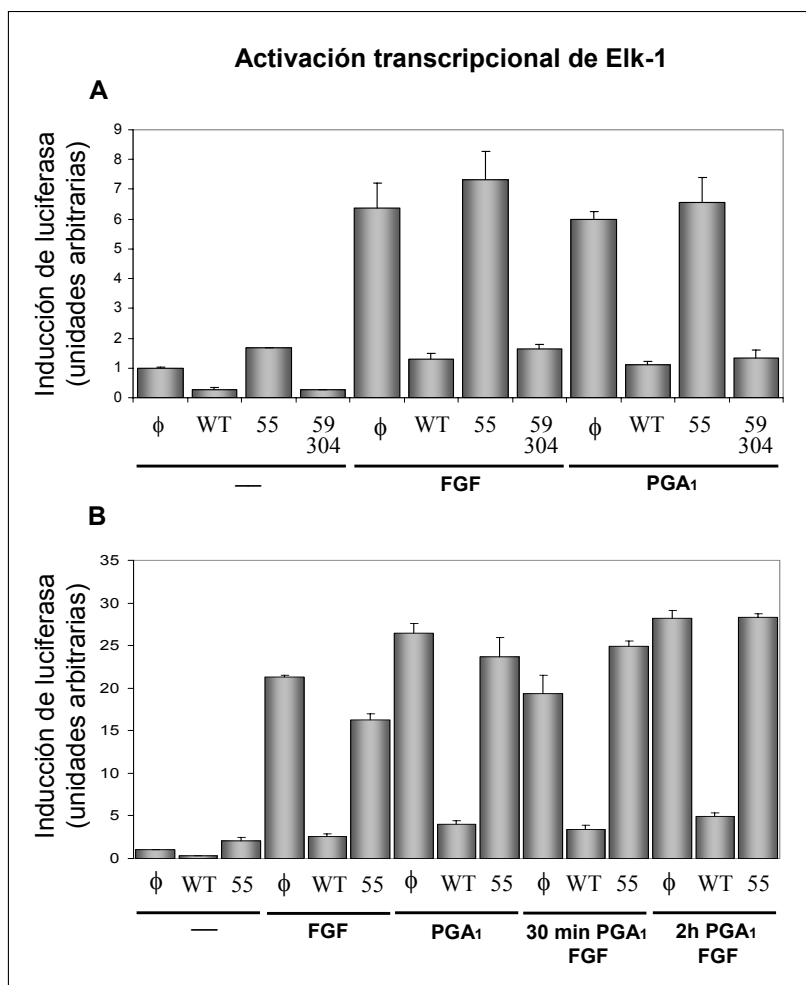


Figura 15. hSpry2 inhibe la activación transcripcional de Elk-1 inducida por PGA₁. Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos para hSpry2-wt, hSpry2-Y55F, hSpry2-P59-304A o vector (φ) además de con los plásmidos para evaluar la activación transcripcional de Elk-1 por ensayos luciferasa (ver Materiales y Métodos). Las células se privaron de suero 18 h. **(A)** Las células se trataron con vehículo (-; DMSO), 50 ng/ml FGF o 10 μM PGA₁ durante 5 h. **(B)** Las células se trataron durante 5 h con vehículo (-; DMSO), FGF o PGA₁ o bien se preincubaron durante 30 minutos o 2h con PGA₁ y a continuación durante 5 h con FGF. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto al vector en ausencia de estimulación. Estos histogramas son representativos de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

2b. hSPRY2 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK INDUCIDA POR PGA₁

El factor de transcripción Elk-1 es una diana de ERK pero también de otras MAPKs, por lo que los datos obtenidos con ensayos luciferasa no reflejan necesariamente la activación de ERK. Por ello, se evaluó la fosforilación de ERK-1 inmunoprecipitada tras la estimulación con FGF o PGA₁, en ensayos de co-transfección con el vector, hSpry2-wt o hSpry2-Y55F. Como muestra la Figura 16A, hSpry2-wt, pero no el mutante Y55F, inhibe la fosforilación de ERK inducida por PGA₁ y por 15dPGJ₂, es decir, hSpry2 afecta a la activación de ERK inducida por estas cyPGs de forma similar a como lo hace con FGF.

No está totalmente resuelto cómo hSpry2 inhibe la activación de ERK en respuesta a FGF. Algunos datos apuntan a que hSpry2 inhibe la activación de Ras (Hanafusa *et al.*, 2002; Lao *et al.*, 2006), mientras que otros apoyan que hSpry2 inhibe la activación de Raf (Tsavachidou *et*

al., 2004; Sasaki *et al.*, 2003). Para determinar si hSpry2 inhibía la activación de Ras inducida por PGA_1 , se co-transfectó HA-K-Ras junto con vector o HA-hSpry2-wt en células HeLa, se estimularon con PGA_1 o EGF y se precipitó Ras activo con GST-Raf-RBD de los extractos celulares (ver Materiales y Métodos). Como se aprecia en la Figura 16B, la activación de K-Ras por PGA_1 no se ve afectada por la presencia de hSpry2. Los datos experimentales obtenidos en

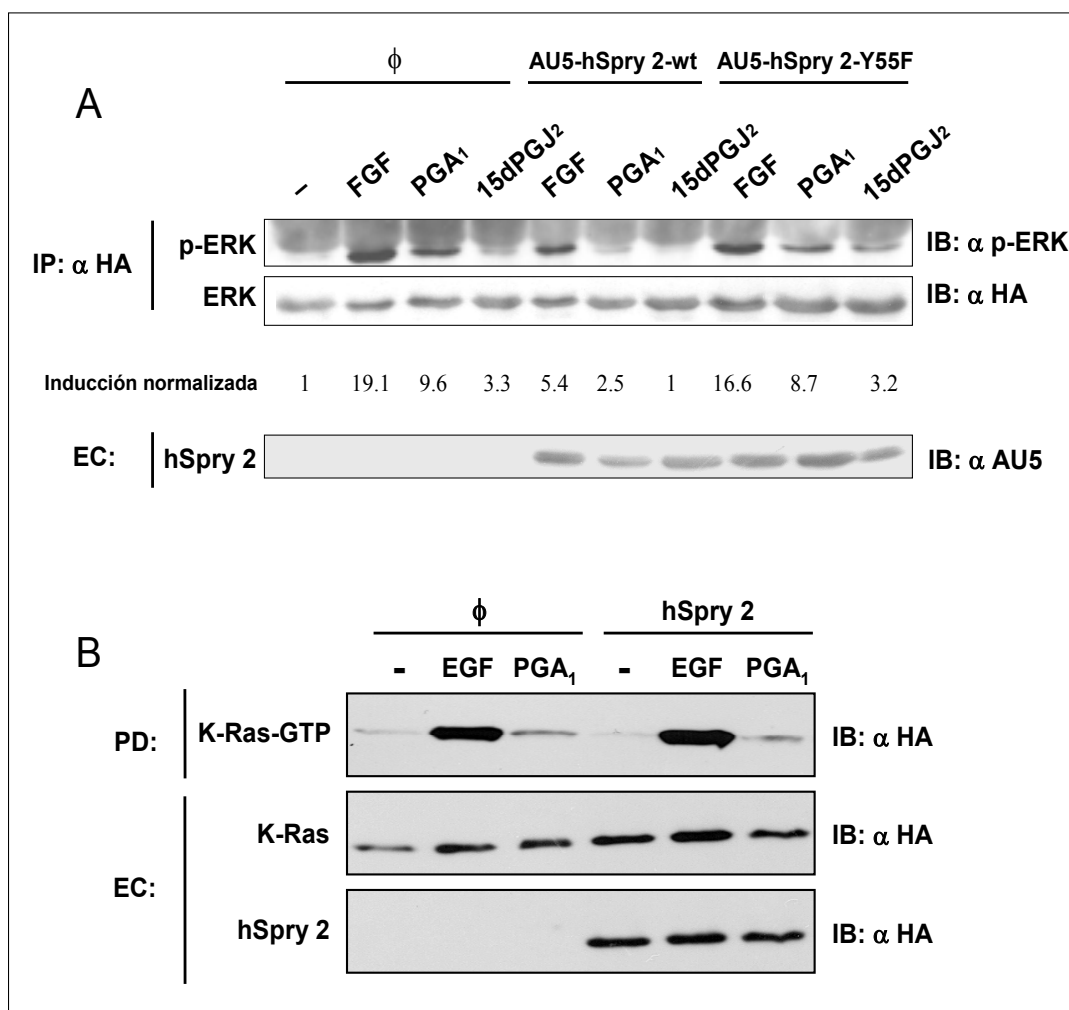


Figura 16. (A) hSpry2 inhibe la activación de ERK inducida por las cyPGs PGA_1 y 15dPGJ₂. Células HeLa se transfectaron con los plásmidos de hSpry2 indicados o vector vacío (ϕ), además de con el plásmido pCEFL-KZ-HA-ERK1. Las células se privaron de suero durante 18 h y se trataron con vehículo (-; DMSO), 25 ng/ml FGF, 10 μ M PGA_1 o 3 μ M 15dPGJ₂ durante 15 min. HA-ERK1 se inmunoprecipitó y su fosforilación se analizó por IB. La misma membrana se deshibridó y se reincubó para analizar los valores de ERK inmunoprecipitados. Los extractos celulares se emplearon también para determinar el nivel de transfección de las construcciones de AU5-hSpry2-wt. Los números debajo del blot para p-ERK y ERK, se corresponden con la cuantificación de los niveles P-ERK/ERK normalizados por los niveles obtenidos en ausencia de estimulación. **(B) La presencia de hSpry2 no inhibe a la activación de Ras por PGA_1 .** Células HeLa se transfectaron con los plásmidos pCEFL-KZ-HA-K-Ras junto con pCEFL-KZ-HA-hSpry2 o vector vacío (ϕ). Tras 18 h privadas de suero, fueron tratadas con vehículo (-; DMSO), 100 ng/ml EGF o 10 μ M PGA_1 durante 15 min. La fracción de Ras-GTP (activo) fue precipitada usando GST-Raf-RBD y analizada por IB con anticuerpo anti-HA (panel superior). Los niveles de expresión de los plásmidos transfectados fueron evaluados por IB usando el anticuerpo anti-HA (paneles inferiores). Para ambos experimentos, resultados similares fueron obtenidos en tres ensayos independientes.

nuestro grupo, apoyan la hipótesis de que hSpry2 no afecta a la activación de Ras inducida por FGF (Martínez *et al.*, 2007; y datos no publicados de la Dra. Martínez), por lo que es posible que hSpry2 también esté actuando en un paso posterior a la activación de Ras. Los datos obtenidos hasta ahora, indican una similitud en el comportamiento de hSpry2 como inhibidor de la activación de ERK inducida tanto por PGA_1 , como por FGF.

2c. NO SE DETECTA LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE hSPRY2 POR PGA_1

Tanto FGF como EGF promueven la fosforilación de la tirosina 55 de hSpry2 (Sasaki *et al.*, 2001). Éste es un residuo fundamental en la funcionalidad de hSpry2, ya que su mutación provoca la pérdida de la capacidad de hSpry2 para inhibir la activación de ERK inducida por FGF (Sasaki *et al.*, 2001). Por todo ello, se quiso comprobar si PGA_1 promovía también la fosforilación de este residuo.

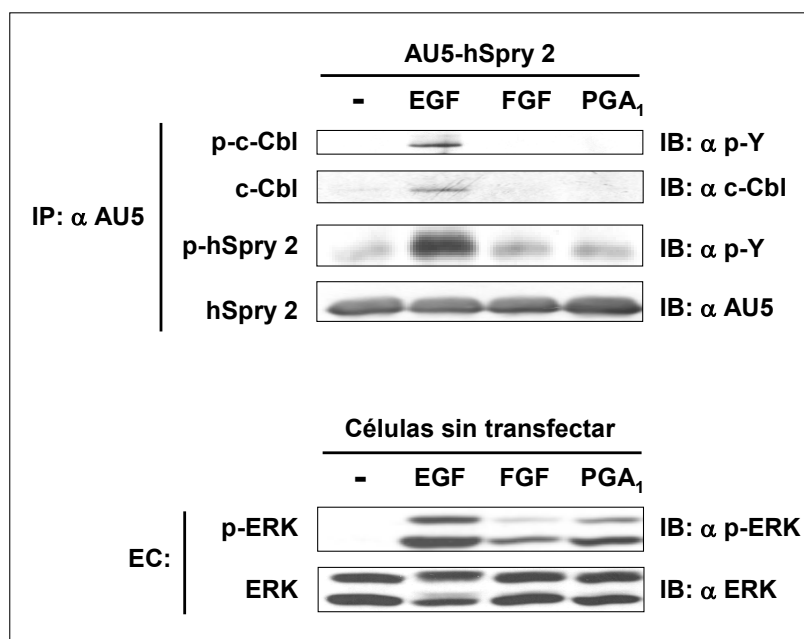


Figura 17. La fosforilación en tirosina de hSpry2 por PGA_1 no se produce o no se detecta. Células HeLa se transfectaron con el plásmido pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-wt, se privaron de suero durante 18 h y se trataron con vehículo (-; DMSO), 100 ng/ml EGF, 50 ng/ml FGF ó 10 μM PGA_1 durante 15 min. AU5-hSpry2-wt se inmunoprecipitó y su fosforilación en tirosina se evaluó por IB. La membrana se deshibridó y se incubó para detectar los niveles de AU5-hSpry2-wt inmunoprecipitado. También se evaluó c-Cbl inmunoprecipitado y la fosforilación en tirosina de c-Cbl. En paralelo, se trataron células sin transfectar para evaluar la fosforilación de ERK endógeno. Este ensayo es representativo de tres experimentos.

Como se puede observar en la Figura 17, no se aprecia que PGA_1 promueva la fosforilación en tirosina de hSpry2 en células HeLa, pero tampoco que lo haga FGF en dichas células, un estímulo que, como se describe ampliamente en la bibliografía (Sasaki *et al.*, 2001), sí promueve la fosforilación en la tirosina 55 de hSpry2. Las células HeLa son de origen epitelial y

su número de receptores para FGF no es muy elevado (Haugsten *et al.*, 2005), por lo que son menos sensibles a este factor de crecimiento. Esto se refleja en los menores niveles de activación de ERK inducidos por FGF en comparación con EGF (Figura 17, paneles inferiores).

La región N-terminal de hSpry2 se une constitutivamente al RING-Finger de c-Cbl, pero esta unión es difícil de detectar por inmunoprecipitación. En células estimuladas por EGF o por FGF, la tirosina 55 de hSpry2 se fosforila y es reconocida por un dominio PTB de c-Cbl (Rubin *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003), esta unión se detecta con mucha facilidad por inmunoprecipitación. Como se aprecia en la Figura 17, c-Cbl endógena co-inmunoprecipita con AU5-hSpry2-wt en las células estimuladas con EGF, pero esta banda es prácticamente indetectable cuando las células no se estimulan o se estimulan con FGF o PGA_1 . También se observa, que la proteína c-Cbl co-inmunoprecipitada con hSpry2 está también fosforilada en tirosina, lo que es esperable ya que tanto el EGF como el FGF promueven esta fosforilación (Galisteo *et al.*, 1995).

Aunque no hemos encontrado en la literatura referencias que describan que PGA_1 activa a las quinasas responsables de la fosforilación de hSpry2 en tirosina, Src o alguna de las quinasas de la familia (Li *et al.*, 2004), sí está descrito que otra cyPG, la 15dPGJ₂ (Ichiki *et al.*, 2004), así lo hace. Aunque ambas cyPGs no tienen los mismos efectos (Oliva *et al.*, 2003; Gayarre *et al.*, 2005 y 2007), si presentan diversos paralelismos (Liu *et al.*, 2003), por lo que es posible que la PGA_1 sea capaz de promover la activación de las quinasas necesarias para la fosforilación en tirosina de hSpry2.

Es posible, que la técnica de IP/IB no tenga la sensibilidad necesaria para la detección de la fosforilación en tirosina de hSpry2 cuando el estímulo no es lo suficientemente potente. PGA_1 y FGF, en células HeLa, inducen unos niveles de fosforilación de ERK mucho menores que EGF y, probablemente, también promuevan la fosforilación en tirosina de hSpry2, pero a un nivel por debajo del umbral de detección por IP/IB. Alternativamente, es plausible que PGA_1 no induzca la fosforilación en tirosina de hSpry2 y el mecanismo por el cual hSpry2 inhibe la activación de ERK inducida por esta cyPG sea distinto del de FGF.

2d. EFECTO DE SPROUTY EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NF- κ B MEDIADA POR PGA_1

El efecto transcripcional de PGA_1 más estudiado en la bibliografía es el bloqueo de la activación de NF- κ B inducida por distintos activadores como $\text{TNF}\alpha$ (Rossi *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1998; Bureau *et al.*, 2002). La única mención de hSpry2 en la vía de NF- κ B en la bibliografía al comenzar este tema de trabajo (Gross *et al.*, 2001), describe que en ensayos luciferasa, hSpry1 y hSpry2 inhiben la activación de NF- κ B inducida por FGF pero no tiene efecto cuando el estímulo es $\text{TNF}\alpha$. No obstante, se quiso comprobar si existía alguna relación entre hSpry2, PGA_1 y NF- κ B.

Se emplearon ensayos luciferasa para NF- κ B (ver Materiales y Métodos), sobreexpresando hSpry2-wt o el mutante Y55F en células HeLa. Se analizó la activación transcripcional de NF- κ B estimulando con PGA₁, TNF α o preincubando con PGA₁ antes de tratar las células con TNF α (Figura 18). Lo que más destaca de los datos obtenidos en estos ensayos, es que la sobreexpresión del mutante Y55F de hSpry2, aumenta *per se* la activación transcripcional de NF- κ B en condiciones de no estimulación y sinérgicamente cuando se estimula con TNF α . Como también se aprecia en la Figura 18, la preincubación con PGA₁ disminuyó ligeramente la actividad transcripcional de NF- κ B promovida por TNF α , siendo este efecto más acentuado en las células que sobreexpresan hSpry2-Y55F. Sin embargo, PGA₁ no afecta a la activación de NF- κ B promovida por la sobreexpresión de hSpry2-Y55F en condiciones de ayuno. Las concentraciones de PGA₁ que se emplean normalmente en la bibliografía para evaluar sus efectos sobre NF- κ B son mayores que las empleadas aquí (Bureau *et al.*, 2002). Probablemente de haberse utilizado concentraciones más altas, el efecto de PGA₁ en la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF α sería más evidente que el detectado en este experimento. Esta es la primera vez que se describe que una proteína de la familia Spry tiene algún efecto en la vía de NF- κ B.

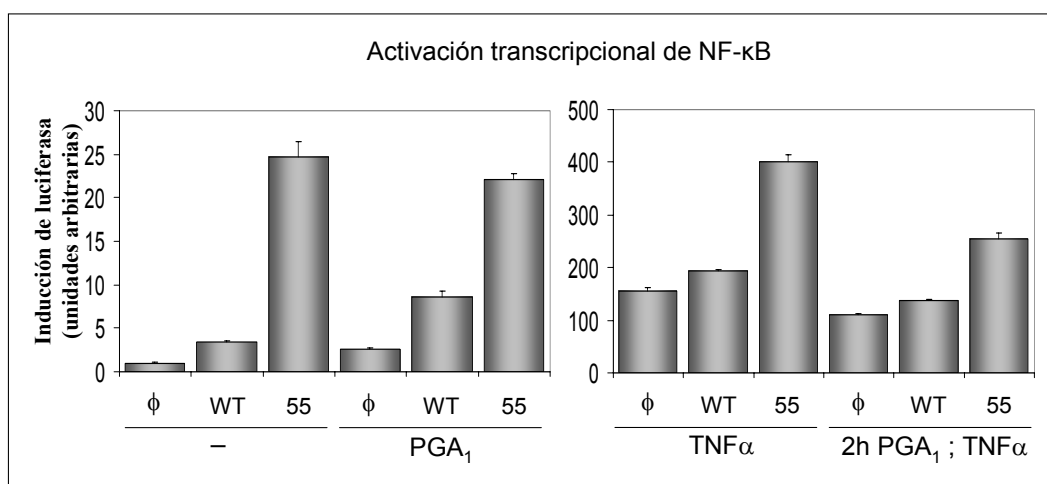


Figura 18. La sobreexpresión del mutante hSpry2-Y55F aumenta la actividad transcripcional de NF- κ B. Células HeLa fueron transfectadas con vector vacío (ϕ), pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-wt o pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-Y55F además de con los plásmidos NF- κ B-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). Las células se privaron de suero 18 h y se trataron con vehículo (-; DMSO), 10 μ M PGA₁ 2 h (panel de la izquierda) o 50 ng/ml TNF α durante 5 h, preincubando con vehículo o 10 μ M PGA₁ (panel de la derecha). Ambos paneles pertenecen al mismo ensayo pero se han separado por la diferencia de escala entre ambas condiciones. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto al vector en ausencia de estimulación. Estos histogramas son representativos de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Se quiso comprobar si el efecto que ejerce la sobreexpresión del mutante Y55F sobre NF- κ B era dependiente del tipo celular. Para ello se realizaron ensayos luciferasa con NF- κ B en células 293T sobreexpresando hSpry2-wt o el mutante Y55F. Los datos que se muestran en la Figura

19, indican que el efecto de este mutante sobre la vía de NF- κ B se reproduce en este tipo celular.

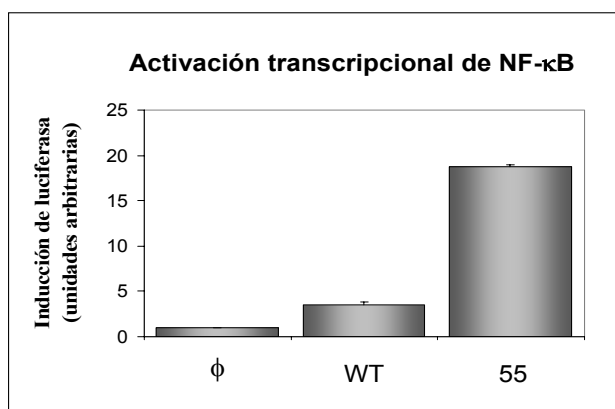


Figura 19. Activación transcripcional de NF- κ B en presencia de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en células 293T. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados junto con los plásmidos NF- κ B-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). 24 h postransfección se evaluó la inducción de luciferasa. Los datos obtenidos se representan como los valores normalizados respecto al vector (ϕ). Este histograma es representativo de otros tres ensayos independientes realizados por triplicado.

3. SPROUTY EN LA VÍA DE NF- κ B

Nos planteamos estudiar si la activación transcripcional de NF- κ B se veía afectada por la presencia de hSpry2-wt y de su mutante Y55F, empleando otros estímulos para cuyas rutas de señalización sí ha sido descrito un papel para hSpry2. EGF estimula NF- κ B por vías poco

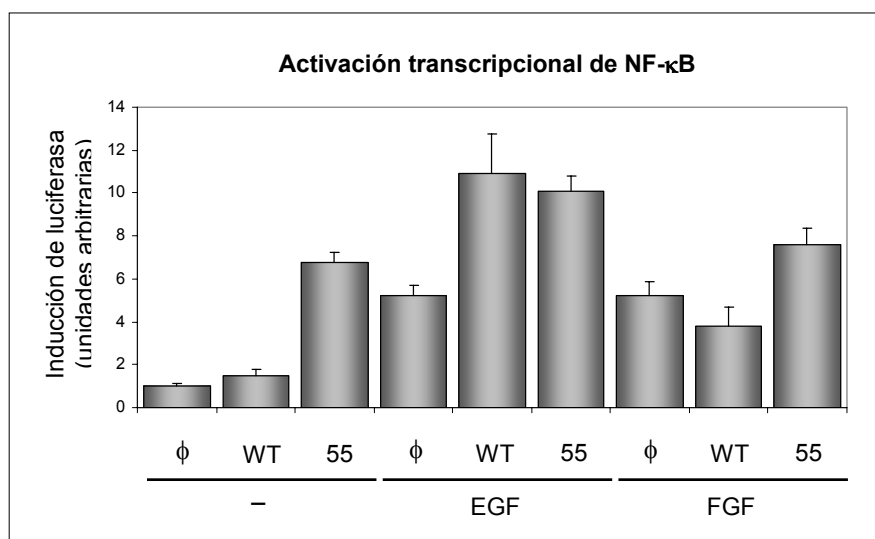


Figura 20. Activación transcripcional de NF- κ B inducida por EGF y FGF en presencia de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F. Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos para las proteínas indicadas además de con los plásmidos NF- κ B-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). Tras 18 h privadas de suero, las células fueron tratadas con vehículo (-; DMSO), 100 ng/ml EGF o 50 ng/ml FGF durante 5 h. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto al vector (ϕ) en ausencia de estimulación. Este histograma es representativo de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

conocidas todavía (Sethi *et al.*, Zhang *et al.* 2006; Millán *et al.*, 2003). En el caso del FGF, existen referencias que describen a este estímulo como un inhibidor (Flati *et al.*, 2006) y como un activador (Tang *et al.*, 2007; Devary *et al.*, 1993) de la vía de NF- κ B.

En células HeLa, FGF y EGF estimulan la actividad transcripcional de NF- κ B con una intensidad mucho menor que TNF α (Figura 20) y hSpry2-wt no inhibe significativamente la activación de NF- κ B en respuesta a FGF. En Gross *et al.* (2001), la activación por FGF que se describe para este factor de transcripción y la inhibición de la misma por la sobreexpresión de hSpry2-wt, son mucho mayores. Una posible explicación para esta discrepancia de resultados, es que en Gross *et al.* (2001) se emplean fibroblastos murinos NIH-3T3 que poseen un mayor número de receptores de FGF que las células HeLa que nosotros empleamos, que son de origen epitelial. En cuanto al mutante hSpry2-Y55F, la activación transcripcional de NF- κ B que éste induce (Figura 20), es similar tanto en condiciones de ayuno como de estimulación por FGF.

En el caso de la estimulación con EGF, la sobreexpresión tanto de hSpry2-wt como de su mutante Y55F, aumenta la activación de NF- κ B por encima de los niveles obtenidos para el vector. Si la activación transcripcional de NF- κ B por EGF está mediada a través de la vía de ERK, estos datos se corresponderían con el papel de hSpry2 como potenciador de la activación de ERK inducida por EGF (Egan *et al.*, 2002).

3a. EL SUPERREPRESOR I κ B α -32-36 INHIBE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B INDUCIDA POR LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2-Y55F

En función de los resultados anteriores, analizamos si la activación transcripcional de NF- κ B inducida por la sobreexpresión de hSpry2-Y55F se veía afectada por la cotransfección con el superrepresor I κ B α -32-36. Esta proteína tiene mutadas las serinas que se fosforilan tras la estimulación con TNF α , paso fundamental para la ubiquitinación y degradación del represor de NF- κ B y, por lo tanto, para la activación de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1996). Como se aprecia en la Figura 21, la presencia de I κ B α -32-36 inhibe la activación transcripcional de NF- κ B promovida por la estimulación con TNF α y por la sobreexpresión de TRAF2. Del mismo modo, la activación de NF- κ B inducida por la sobreexpresión del mutante hSpry2-Y55F también está completamente inhibida en presencia de este superrepresor, tanto en condiciones de estimulación con TNF α como de ayuno. Estos datos parecen indicar que hSpry2-Y55F ejerce su efecto por encima de este punto en la ruta de activación de NF- κ B. Por otro lado, puesto que en principio I κ B α -32-36 inhibe la activación de la ruta canónica de activación de NF- κ B, este dato sugiere que hSpry2-Y55F afecta a esta ruta y no a otras, no obstante, no se puede confirmar hasta que no se utilicen inhibidores químicos y dominantes negativos de proteínas involucradas en las otras rutas de activación de NF- κ B.

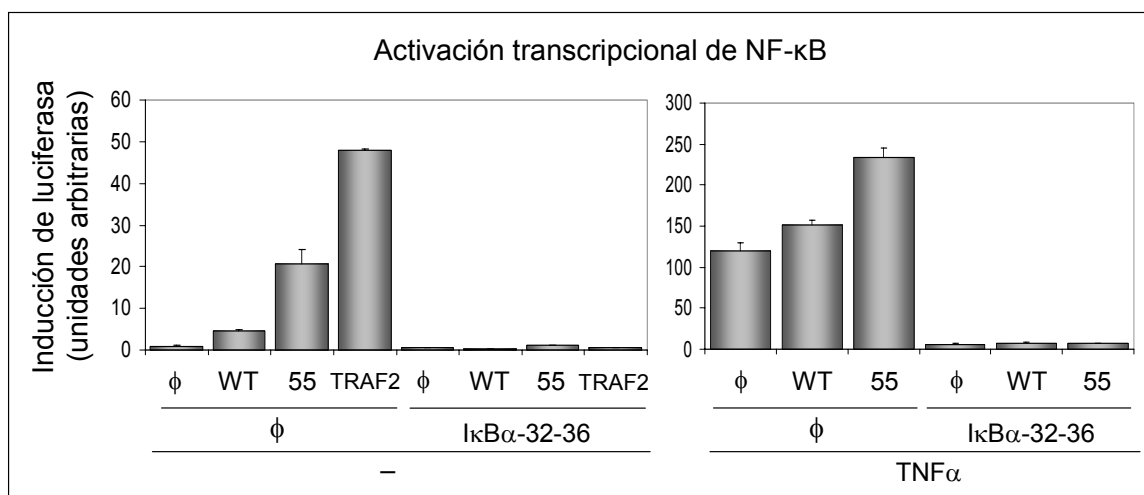


Figura 21. El súperrepresor IκBα-32-36 inhibe la activación transcripcional de NF-κB inducida por la sobreexpresión del mutante hSpry2-Y55F. Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos para hSpry2-wt, hSpry2-Y55F, TRAF2, IκBα-32-36 o vector (φ) además de con los plásmidos NF-κB-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). Las células se privaron de suero 18 h y se estimularon, o no, con 50 ng/ml TNFα durante 5h. Ambos paneles pertenecen al mismo ensayo pero se han separado por la diferencia de escala entre ambas condiciones. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto al vector en ausencia de estimulación. Estos histogramas son representativos de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

3b. NO SE DETECTA LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE hSPRY2 POR TNFα

Dadas las diferencias en la activación de NF-κB por TNFα cuando hSpry2-wt o el mutante Y55F se sobreexpresan (Figura 18), se quiso estudiar si TNFα promovía la fosforilación en la tirosina de hSpry2. Como se puede observar en la Figura 22, no se aprecia que TNFα induzca

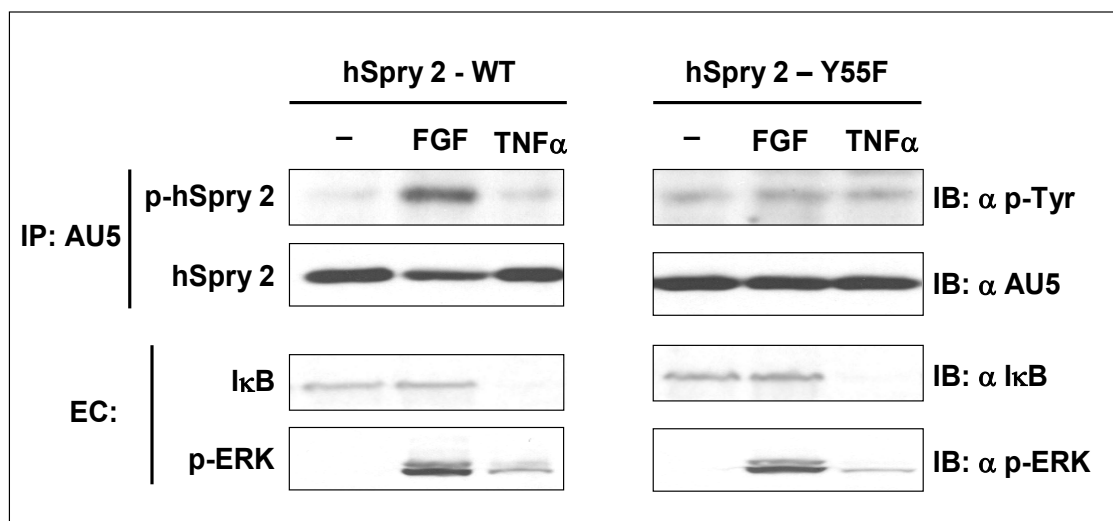


Figura 22. No se detecta la fosforilación en tirosina de hSpry2 por la estimulación por TNFα. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos para hSpry2-wt o hSpry2-Y55F. Tras 18 h privadas de suero, las células se estimularon con 50 ng/ml FGF 10 min o 50 ng/ml TNFα 20 min, y se inmunoprecipitaron las proteínas transfectadas. La fosforilación en tirosina se evaluó por IB del inmunoprecipitado. La membrana se deshibridó y se incubó para evaluar los niveles de proteína inmunoprecipitada. Los extractos celulares se emplearon para evaluar los niveles de IκBα y de p-ERK. Este experimento es representativo de tres ensayos independientes.

fosforilación en tirosina de hSpry2. No obstante, es posible, que $\text{TNF}\alpha$ sí promueva esta fosforilación pero en un tiempo distinto al medido en estos ensayos, o bien que esté por debajo del umbral de detección de la técnica IP/IB. Está descrito que $\text{TNF}\alpha$ promueve la activación del EGFR (Yamaoka *et al.*, 2008) y de c-Src, quinasa que además interacciona con TNFRI (Pincheira *et al.*, 2008), por lo que es de esperar que las tirosín-quinazas que fosforilan a hSpry2 se activen por la estimulación con $\text{TNF}\alpha$.

3c. LA SOBREEXPRESIÓN CONJUNTA DE TRAF2 Y hSPRY2-Y55F ACTIVA TRANSCRIPCIONALMENTE A NF- κ B DE FORMA SINERGÍSTICA

Los efectos de hSpry2-Y55F en la activación transcripcional de NF- κ B eran tan novedosos, que quisimos profundizar en el papel de hSpry2 en esta vía. Para empezar, se buscó en diversas bases de datos si estaba descrita la interacción de hSpry2 con alguna proteína implicada en la vía de NF- κ B. En la base de datos de biogrid (<http://www.thebiogrid.org/>; Stark *et al.*, 2006) figuraba que según un estudio de doble híbrido a gran escala (Rual *et al.*, 2005), hSpry2 interaccionaba con la proteína TRAF2, una proteína importante en la transducción de señales desde el TNFR (Chung *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004). En el trabajo de Rual *et al.* (2005), se analizan 7500 ORFs completos de proteínas humanas utilizando tres genes inducibles diferentes; una fracción de los resultados positivos, se confirman por ensayos de pull-down, con una confirmación del 85,5%, pero la interacción entre hSpry2 y TRAF2 no se comprobó por este sistema.

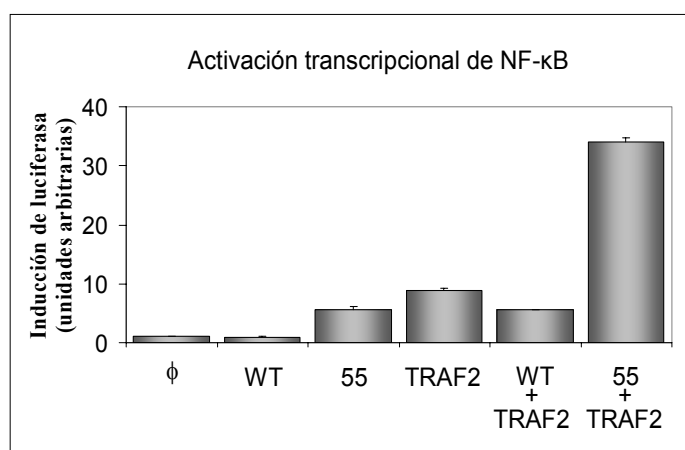


Figura 23. La sobreexpresión conjunta de hSpry2-Y55F y TRAF2 activa sinérgicamente NF- κ B. Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos para hSpry2-wt, hSpry2-Y55F, TRAF2 o vector (ϕ) indicadas además de con los plásmidos de NF- κ B-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). Tras 18 h privadas de suero se analizó la inducción de luciferasa y de renilla. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto al vector. Este histograma es representativo de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En la bibliografía está descrita otra ubiquitina ligasa, llamada Siah2 (seven in absentia homólogo 2; Hu *et al.*, 1997; Carthew y Rubin, 1990), que interacciona y ubiquitina a hSpry2 promoviendo su degradación (Nadeau *et al.*, 2007). El dominio de unión a ligando de Siah2 es, en su estructura tridimensional, muy parecido al dominio C-TRAF de TRAF2, a pesar de la

ausencia de homología entre ambas secuencias (Polekhina *et al.*, 2002). Ambas proteínas presentan una distribución de dominios similar y sí poseen cierta homología de secuencia en su RING-finger (Polekhina *et al.*, 2002). Siah2 interacciona con TRAF2, lo ubiquitina y promueve su degradación en condiciones de estrés (Habelhah *et al.*, 2002).

Además, TRAF2 actúa en la vía de TNFR/NF- κ B por encima de la degradación de I κ B, como según nuestros datos, está haciendo hSpry2-Y55F (Figura 21). Esto sumado a los resultados publicados de doble-híbrido y la existencia de una proteína estructuralmente parecida a TRAF2 que interacciona tanto con hSpry2, como con TRAF2, convertían a TRAF2 representaba un buen candidato por el cual se pudiese vincular a hSpry2 en la vía de NF- κ B.

Se ha descrito que la sobreexpresión de TRAF2 activa NF- κ B, por un mecanismo poco conocido que se cree que involucra la oligomerización de TRAF2 (Baud *et al.*, 1999). Ante la posibilidad de que hSpry2 interaccione con TRAF2 (Rual *et al.*, 2005), estudiamos los efectos transcripcionales sobre NF- κ B que tiene la sobreexpresión conjunta de TRAF2 y del mutante Y55F de hSpry2. Como se puede observar en la Figura 23, la sobreexpresión de TRAF2 aumenta la activación transcripcional de NF- κ B más potentemente que la sobreexpresión de hSpry2-Y55F, pero la sobreexpresión simultánea de ambas proteínas tiene efectos sinérgicos sobre esta vía en células sin estimular.

3d. LA SOBREEXPRESIÓN DE TRAF2 INHIBE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE ELK-1 INDUCIDA POR FGF

No está descrito que TRAF2 actúe en la ruta de señalización del FGFR, por lo que se analizó si esta proteína afectaba a la ruta de activación de Elk-1 inducida por FGF y si su sobreexpresión afectaba a la inhibición que ejerce hSpry2 sobre esta ruta. Para ello, se realizaron ensayos luciferasa con este factor de transcripción sobreexpresando TRAF2 sólo, conjuntamente con hSpry2-wt o hSpry2-Y55F, y en condiciones de ayuno o de estimulación con FGF. Como se observa en la Figura 24, la sobreexpresión de TRAF2 no afecta a la activación de Elk-1 en condiciones de ayuno. Sin embargo, en condiciones de estimulación por FGF, TRAF2 inhibe la activación transcripcional de Elk-1. Cómo estaría TRAF2 afectando a la ruta de señalización del FGFR se desconoce.

La sobreexpresión de TRAF2 no produce una activación de ERK pero sí de JNK (Reinhard *et al.*, 1997). Por otro lado, está descrito que una activación constitutiva de JNK desacopla la activación de MEK inducida por estímulos mitogénicos como el EGF de la estimulación de ERK (She *et al.*, 2003). Por tanto, es posible que la activación de JNK promovida por la sobreexpresión de TRAF2, esté impidiendo la activación de ERK inducida por FGF. No obstante esta hipótesis no se puede confirmar hasta que no se realicen experimentos inhibiendo la ruta de JNK, por ejemplo con inhibidores químicos.

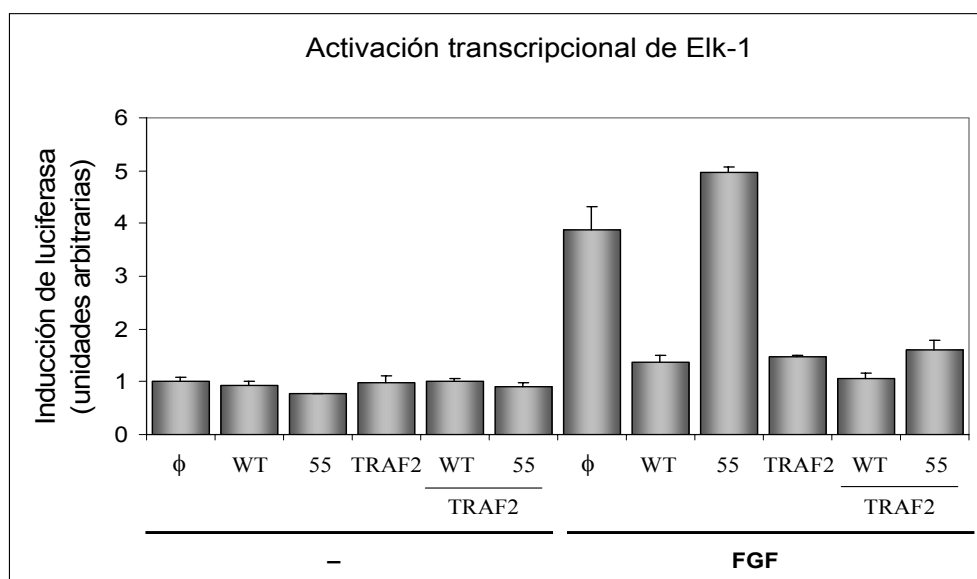


Figura 24. La sobreexpresión de TRAF2 inhibe la activación transcripcional de Elk-1 inducida por FGF. Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos hSpry2-wt, hSpry2-Y55F, TRAF2 o vector (ϕ) además de con los plásmidos necesarios para evaluar la activación transcripcional de Elk-1 por ensayos luciferasa (ver Materiales y Métodos). Las células se privaron de suero 18 h y se estimularon, o no, con 50 ng/ml FGF 5 h. Los valores representan los datos obtenidos normalizados respecto a las células transfectadas con vector sin estimular. Este histograma es representativo de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

3e. TRAF2 CO-LOCALIZA PARCIALMENTE CON hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F

Para investigar la posible interacción *in vivo* entre TRAF2 y hSpry2, se transfectaron células HeLa y se realizaron inmunofluorescencias para determinar si las proteínas co-localizaban. En la Figura 25A y B se muestra la distribución de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en estas células, en distintos planos confocales transversales tomados alrededor del núcleo. Tanto hSpry2-wt como hSpry2-Y55F se localizan en pequeñas vesículas o puntos distribuidos principalmente en el citosol, aunque sorprendentemente algunos se encuentran localizados en el núcleo. No existen referencias que describan una localización nuclear de hSpry2. Puede ser que su sobreexpresión fuerce esta localización de forma artefactual, no obstante, la mayoría de las inmunofluorescencias publicadas con hSpry2 están realizadas también en condiciones de sobreexpresión. Una publicación reciente muestra inmunofluorescencias de hSpry2 endógeno, en mioblastos murinos C2C12, y sobreexpresado en células Cos1 y MDCK (Kim *et al.*, 2007a) y la distribución de hSpry2 en todas estas células es parecida entre sí y similar a la que nosotros detectamos. En este trabajo no se menciona que hSpry2 tenga una localización nuclear, no obstante observando las inmunofluorescencias mostradas en este trabajo, no se puede descartar que así sea.

En la mayoría de las células, TRAF2 sobreexpresado se distribuye por el citoplasma además, de en unas vesículas voluminosas que son visibles incluso en la imagen de contraste interdifere-

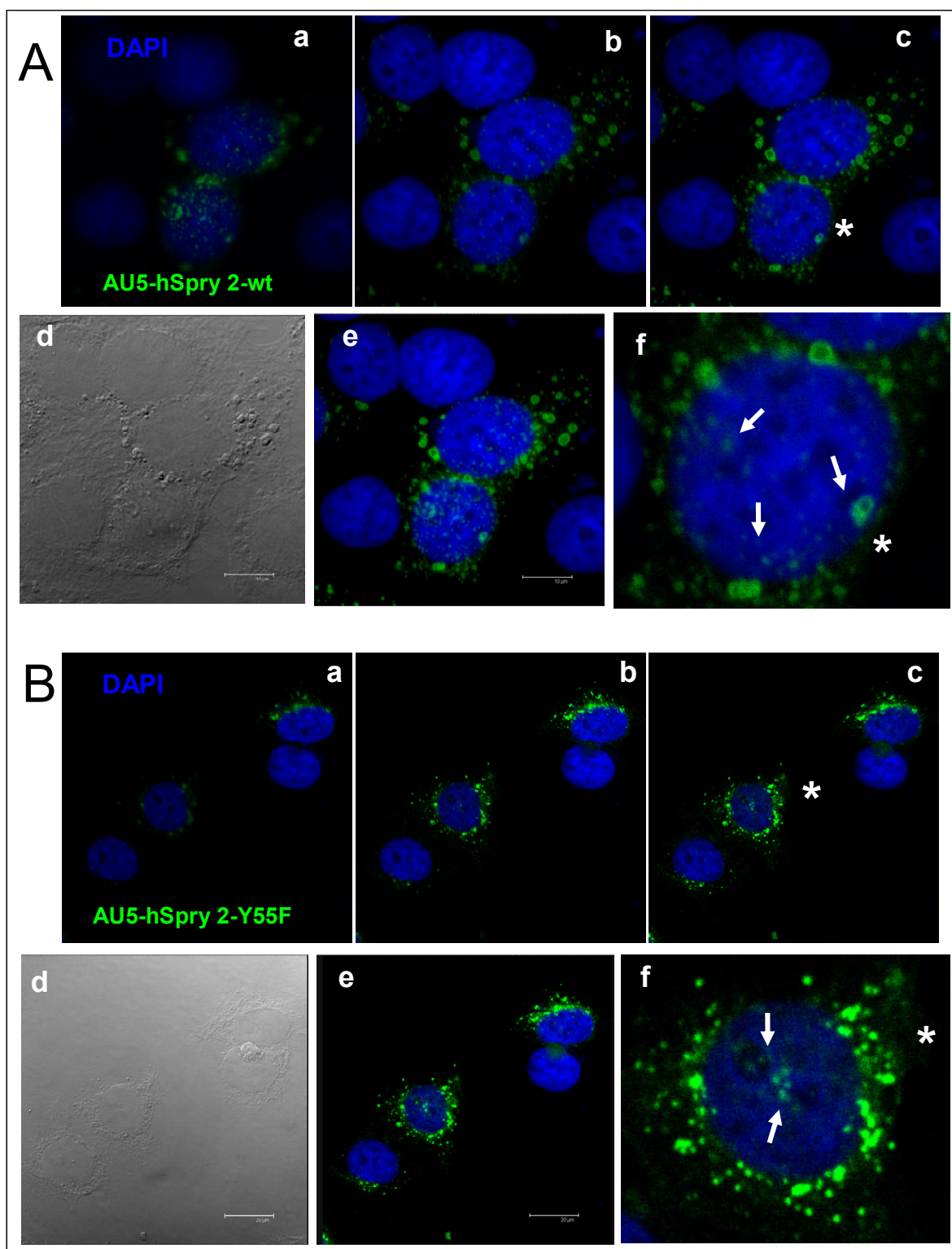


Figura 25. Localización de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F sobreexpresado en células HeLa. Inmunofluorescencias de hSpry2-wt (**A**) o hSpry2-Y55F (**B**) sobreexpresados en células HeLa, Las proteínas hSpry2-wt/Y55F aparecen en verde y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los paneles (**a**), (**b**) y (**c**) se corresponden con distintos planos confocales transversales. Los paneles (**d**) se corresponden con las imágenes de contraste interferencial y los paneles (**e**) con las proyecciones de los distintos planos tomados. En los paneles (**f**) aparecen ampliadas las células señaladas en los paneles (**c**) con un asterisco; las flechas blancas señalan localizaciones nucleares de hSpry2-wt/Y55F.

rencial (DIC) (Figura 26). Existen pocos trabajos en los que se hayan realizado inmunofluorescencias de esta proteína. La naturaleza de estas vesículas se desconoce porque no se han llegado a utilizar marcadores específicos para determinar el tipo de orgánulo que representan, no obstante, el patrón podría corresponderse con endosomas (Husebye *et al.*, 2006).

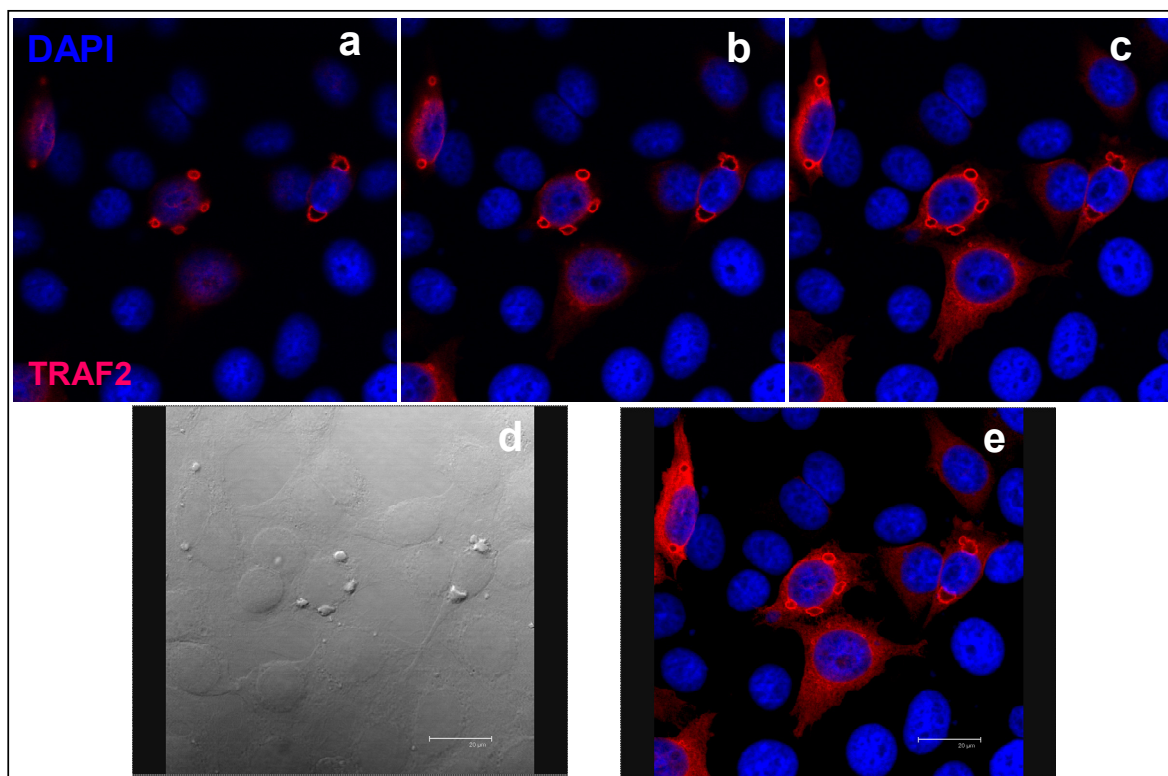


Figura 26. Inmunofluorescencia de células HeLa transfectadas con TRAF2. Para la detección de TRAF2 se utilizó un secundario marcado con Alexa 647 y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los paneles (a), (b) y (c) se corresponden con distintos planos confocales transversales. El panel (d) es la imagen de contraste interferencial y el panel (e) es la proyección de los distintos planos tomados.

Cuando hSpry2-wt o hSpry2-Y55F están sobreexpresados junto con TRAF2, parte de la proteína hSpry2-wt o Y55F se relocaliza en las vesículas que la sobreexpresión de TRAF2 provoca (Figura 27A y B respectivamente), aunque TRAF2 está preferentemente localizado rodeando a hSpry2. La co-localización TRAF2-hSpry2 tiene lugar en estas vesículas, así como en zonas citoplasmáticas.

3f. TRAF2 INTERACCIONA *IN VIVO* CON hSPRY2

Para determinar si TRAF2 interacciona con hSpry2-wt y hSpry2-Y55F, además de co-localizar, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, se transfectaron células 293T con TRAF2 y hSpry2-wt o el mutante Y55F. Los extractos celulares se utilizaron para

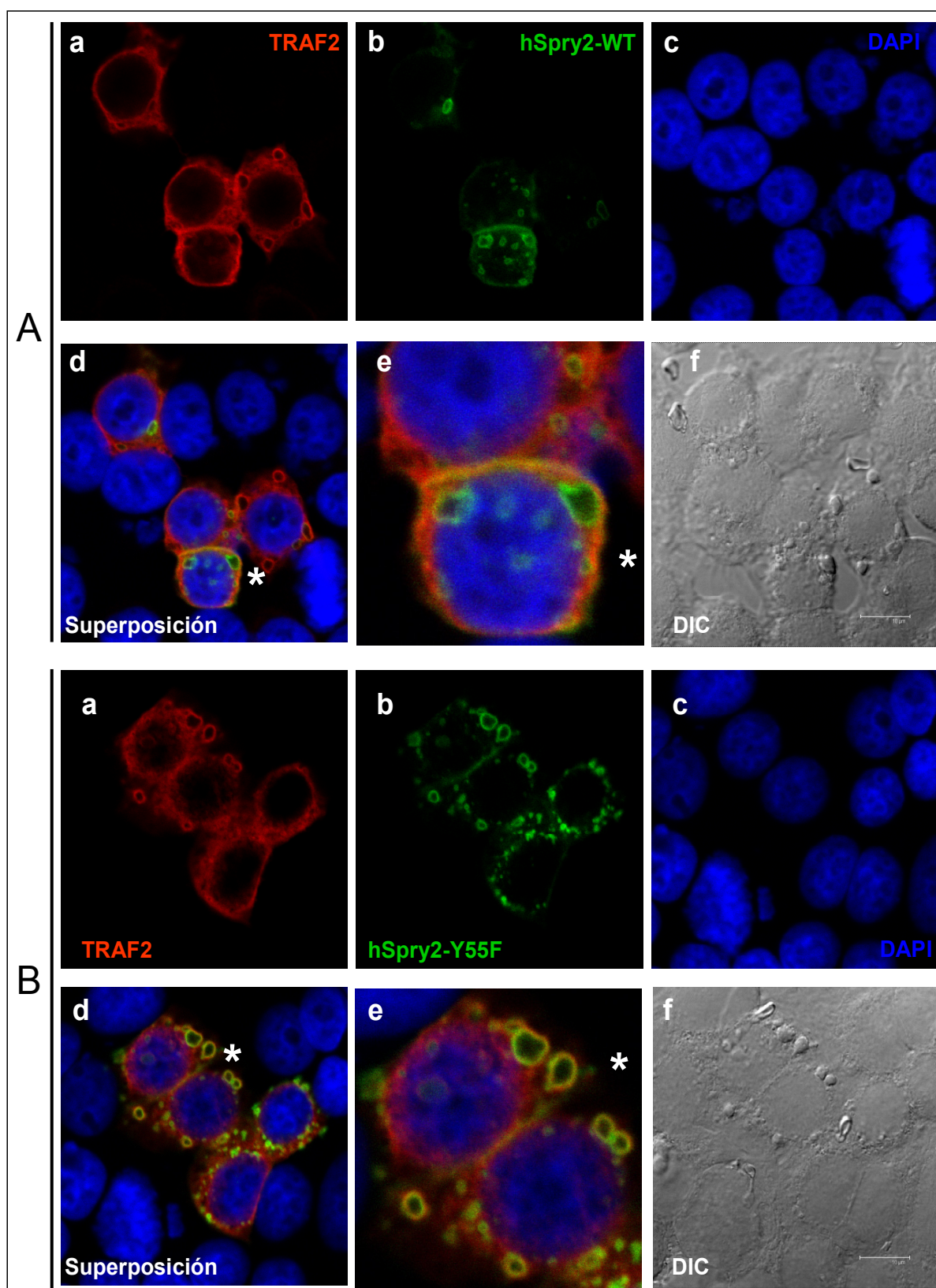


Figura 27. TRAF2 co-localiza parcialmente con hSpry2-wt y hSpry2-Y55F. Inmuno-fluorescencias en células HeLa de TRAF2 sobreexpresado conjuntamente con hSpry2-wt (**A**) o hSpry2-Y55F (**B**). TRAF2 aparece en rojo [paneles (**a**)] y hSpry2-wt y su mutante Y55F en verde [paneles (**b**)]. Los núcleos han sido teñidos con DAPI [azul, paneles (**c**)]. Los paneles (**d**) se corresponden con la superposición de TRAF2, hSpry2-wt/Y55F y DAPI. Los paneles (**e**) muestran una ampliación de la célula señalada con un asterisco en los paneles (**d**) y los paneles (**f**) son las imágenes de contraste interferencial (DIC).

inmunoprecipitar las proteínas hSpry2 (Figura 28A) o bien la proteína TRAF2 (Figura 28B). TRAF2 co-inmunoprecipita en la misma medida con hSpry2-wt que con su mutante Y55F.

Es difícil asegurar si esta interacción es directa o no. Los datos publicados de la interacción entre hSpry2 y TRAF2 por doble-híbrido (Rual *et al.*, 2005) apuntan a que probablemente sea directa. Por otro lado, dados los tampones de lisis y de lavado empleados en las co-inmunoprecipitaciones (ver Materiales y Métodos), las condiciones de co-inmunoprecipitación empleadas son relativamente astringentes, lo que también podría sugerir que la interacción es directa, no pudiendo excluirse que ambas proteínas formen parte de algún complejo multi-proteico.

Como TRAF2 interacciona tanto con hSpry2-wt como con el mutante Y55F, parece improbable que esta interacción sea la explicación del distinto comportamiento en la activación transcripcional de NF- κ B entre hSpry2 y el mutante de Y55F. No obstante, esta interacción hace más plausible que hSpry2 juegue un papel en la vía de NF- κ B dada la importancia que TRAF2 tiene en la activación de este factor transcripcional en la señalización por TNF α .

3g. Δ TRAF2 INTERACCIONA CON hSPRY2 *IN VIVO*

hSpry2 interacciona con distintas proteínas que cuentan con un RING-finger y que, al igual que TRAF2, son ubiquitina ligasas: Cbl (Wong *et al.*, 2001) y Siah2 (Nadeau *et al.*, 2007). Por otro lado, el RING-finger de TRAF2, además de poseer su actividad ubiquitina ligasa (Habelhah *et al.*, 2004), es un dominio de interacción con proteínas como IKK α o IKK β (Devin *et al.*, 2001).

Por ello, quisimos estudiar si el mutante de Δ TRAF2, un mutante de delección que carece de los aminoácidos 6-86 y por tanto del RING-finger de TRAF2, era capaz de interactuar con hSpry2 *in vivo*. Como se aprecia en la Figura 29, Δ TRAF2 une con la misma afinidad a hSpry2 que a TRAF2, por lo que el RING-finger de TRAF2 es prescindible para su unión a hSpry2. Los mismos resultados se obtuvieron para hSpry2-Y55F y en condiciones de estimulación con TNF α (datos no mostrados).

Un efecto que se producía en la mayoría de los experimentos en los que se co-transfectaba TRAF2 con hSpry2-wt o hSpry2-Y55F, es que la sobreexpresión de TRAF2 parecía afectar a la cantidad de ambas proteínas hSpry2. Este efecto lo achacamos a la actividad ubiquitina ligasa de TRAF2, aunque no se llegaron a utilizar inhibidores del proteasoma, ni de lisosomas, para determinar la naturaleza exacta de este fenómeno. Sin embargo, sí apreciamos que las cantidades de proteína hSpry2-wt y hSpry2-Y55F aumentaban cuando se co-expresaban con Δ TRAF2. Como el mutante Δ TRAF2 carece de la función Ub-ligasa, y ya que su sobreexpresión estabiliza a las proteínas hSpry2, es posible que compita con otras Ub-ligasa que degradan a hSpry2.

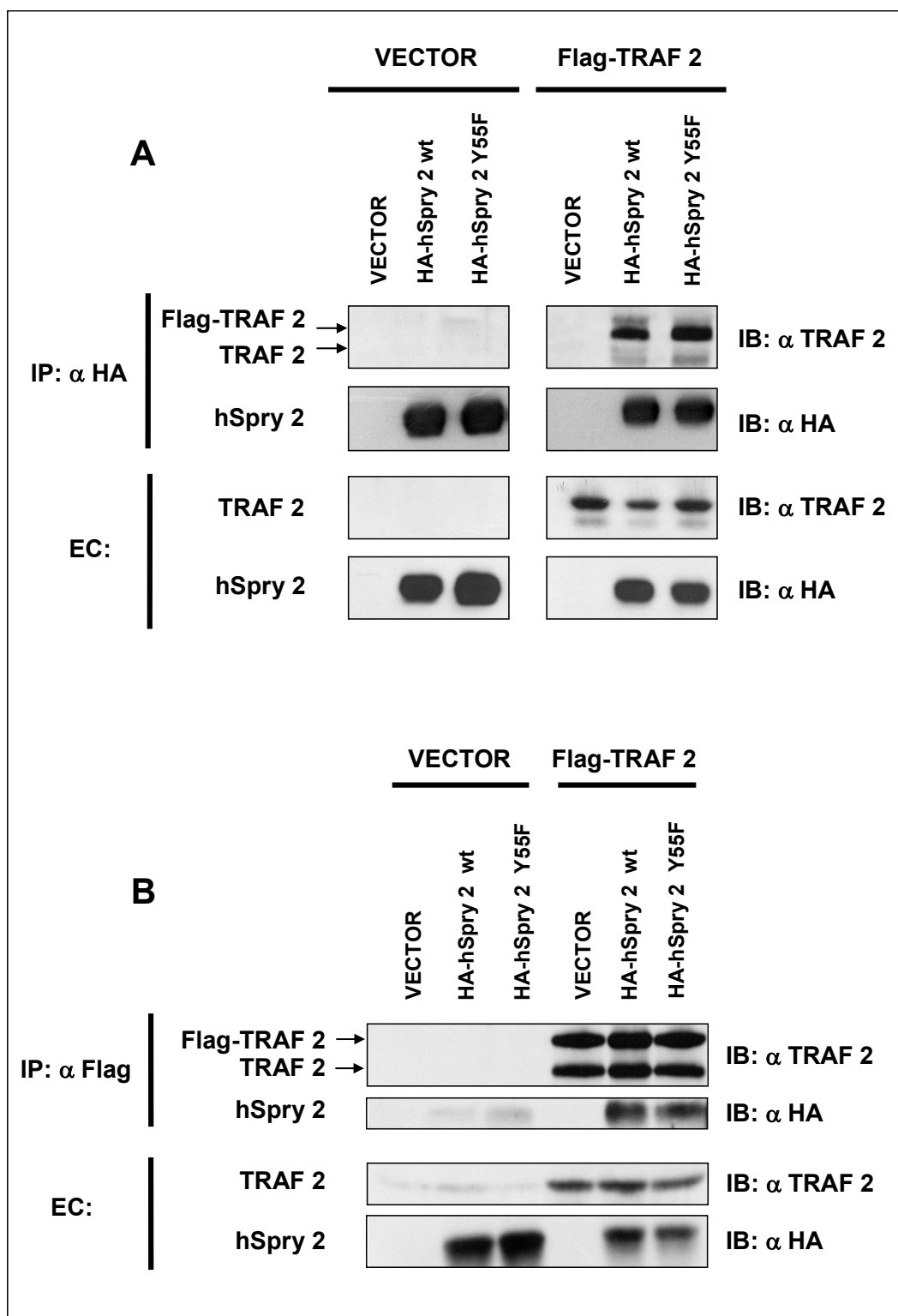


Figura 28. TRAF2 interacciona *in vivo* con hSpry2-wt y hSpry2-Y55F. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos para las proteínas indicadas. **(A)** TRAF2 co-inmunoprecipita con hSpry2-wt y hSpry2-Y55F. 24 h postranfección los extractos celulares se procesaron según las indicaciones de μ MACS (Miltenyi Biotec) para inmunoprecipitar las proteínas transfectadas con el epítipo HA. **(B)** hSpry2 y hSpry2-Y55F co-inmunoprecipitan con TRAF2. 24 h postranfección los extractos celulares se incubaron con anticuerpo anti-Flag unido a sepharosa. En ambos paneles, los inmunoprecipitados y una fracción de los extractos se analizaron por IB con los anticuerpos indicados. Este blot es representativo de tres ensayos independientes.

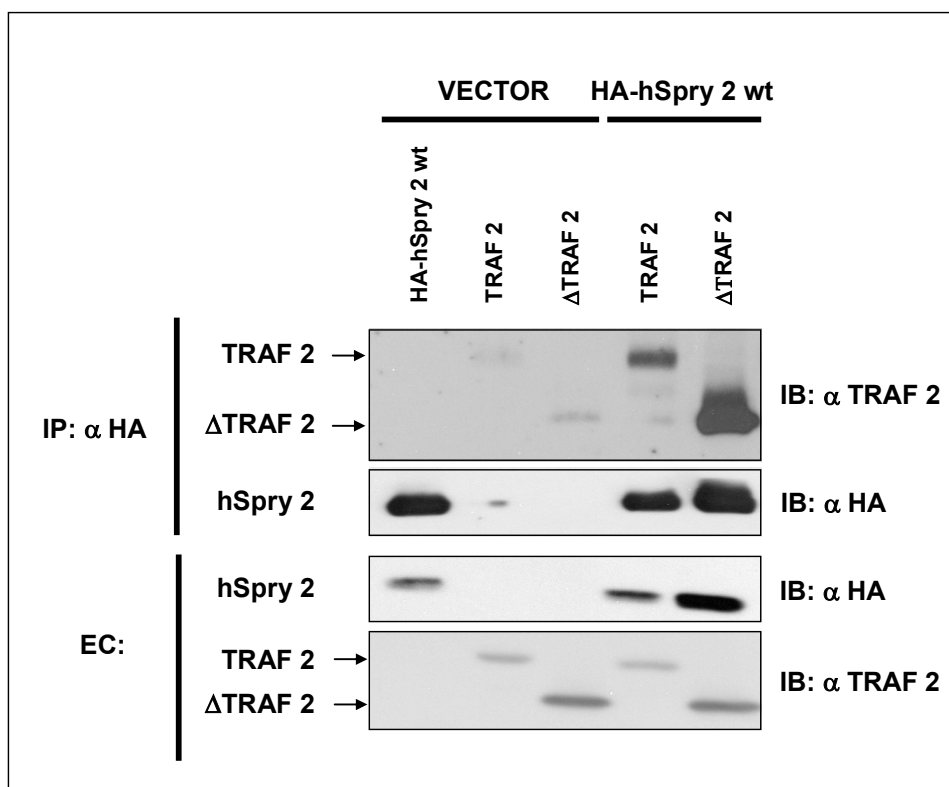


Figura 29. TRAF2 y Δ TRAF2 co-inmunoprecipitan con HA-hSpry2-wt. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos para las proteínas indicadas. 24 h postransfección los extractos celulares se procesaron según las indicaciones de μ MACS (Myltenyi Biotech) para inmunoprecipitar las proteínas transfectadas con el epítipo HA. Los inmunoprecipitados y una fracción de los extractos se analizaron por IB con los anticuerpos correspondientes. Este blot es representativo de tres ensayos.

3h. EL MUTANTE PQD DE hSPRY2 INTERACCIONA *IN VIVO* CON TRAF2

Puesto que la unión de hSpry2 no es a través del RING-finger de TRAF2, es posible que sea a través de su dominio TRAF, dominio por el cuál TRAF2 interacciona con otras proteínas como TNFR1 (Rothe *et al.*, 1994), CD40 (Pullen *et al.*, 1998 y 1999), TANK1 (Rothe *et al.*, 1996) o la proteína del virus Epstein-Bar LMP1 (Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996; Busch y Bishop, 2001).

La bibliografía define dos secuencias consenso de unión a TRAF2 (Ye y Wu, 2000) y, más concretamente, a la región característica de esta familia de proteínas llamada dominio TRAF (Rothe *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995). Las dos secuencias consenso de unión al dominio TRAF se denominan "consenso menor" y "consenso mayor", en referencia a la abundancia de proteínas que presentan sendas secuencias consenso. Como aparece reflejado en la Figura 30, hSpry2 presenta en su extremo N-terminal cierta homología con la secuencia de unión "consenso menor". También observamos que en la secuencia de c-Cbl, una ubiquitina ligasa muy relacionada con hSpry2, también existe una región que coincide exactamente con la

secuencia de unión "consenso mayor" de unión a TRAF2.

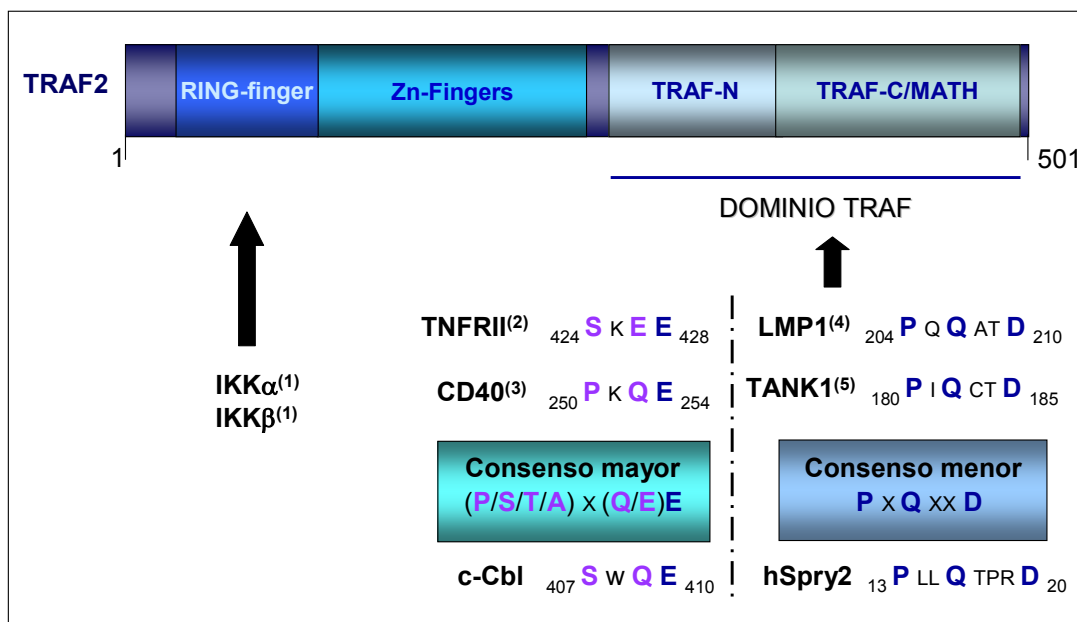


Figura 30. Estructura de la proteína TRAF2 y descripción de las secuencias consenso de unión al dominio TRAF. TRAF2 posee un dominio RING-finger en su extremo N-terminal seguido de cinco Zn-fingers. El dominio TRAF, característico de esta familia, se subdivide en dos regiones, el subdominio TRAF-N, que tiene una estructura de bucle súper-enrollado (coiled coil), y el subdominio TRAF-C, que es el más conservado. Todos los miembros canónicos de la familia TRAF poseen esta distribución de dominios, a excepción de TRAF1 que carece del RING-finger. El subdominio TRAF-C/MATH es compartido por una familia funcionalmente no relacionada, las meprinas (metaloproteinasas extracelulares, Uren y Vaux, 1996), de ahí que este dominio se denomine también MATH por *Meprin and TRAF homology domain*. ⁽¹⁾Devin *et al.*, 2001; ⁽²⁾Rothe *et al.*, 1994, ⁽³⁾Pullen *et al.*, 1998 y 1999; ⁽⁴⁾Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996; Busch y Bishop, 2001; ⁽⁵⁾Rothe *et al.*, 1996.

Para determinar si hSpry2 se une a TRAF2 por esta secuencia similar a la "consenso menor", se mutaron a alanina los aminoácidos conservados de esta secuencia en hSpry2-wt y hSpry2-Y55F: P13, Q15 y D20 (hSpry2-PQD y hSpry2-PQD-Y55F). Como se puede observar en la Figura 31, la capacidad de estos dos mutantes de hSpry2 de co-inmunoprecipitar TRAF2 se mantiene intacta, por lo que la secuencia 13-P-LL-Q-TPR-D-20 de hSpry2 no es la responsable de su unión a TRAF2.

Es posible que hSpry2 interaccione con TRAF2 por una secuencia distinta a las secuencias consenso descritas. Los monómeros de TRAF2 interaccionan entre sí a través del dominio TRAF estableciendo interacciones no relacionadas con las secuencias consenso (Park *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2007). Lo mismo ocurre con la interacción entre TRADD y TRAF2 (Askenasi y Dixit, 1998; Chung *et al.*, 2007).

TRAF2 cristaliza formando trímeros (Park *et al.*, 1999) y aunque no existe una estructura cristalina de hSpry2, está descrito que dimeriza (Nadeau *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2001;

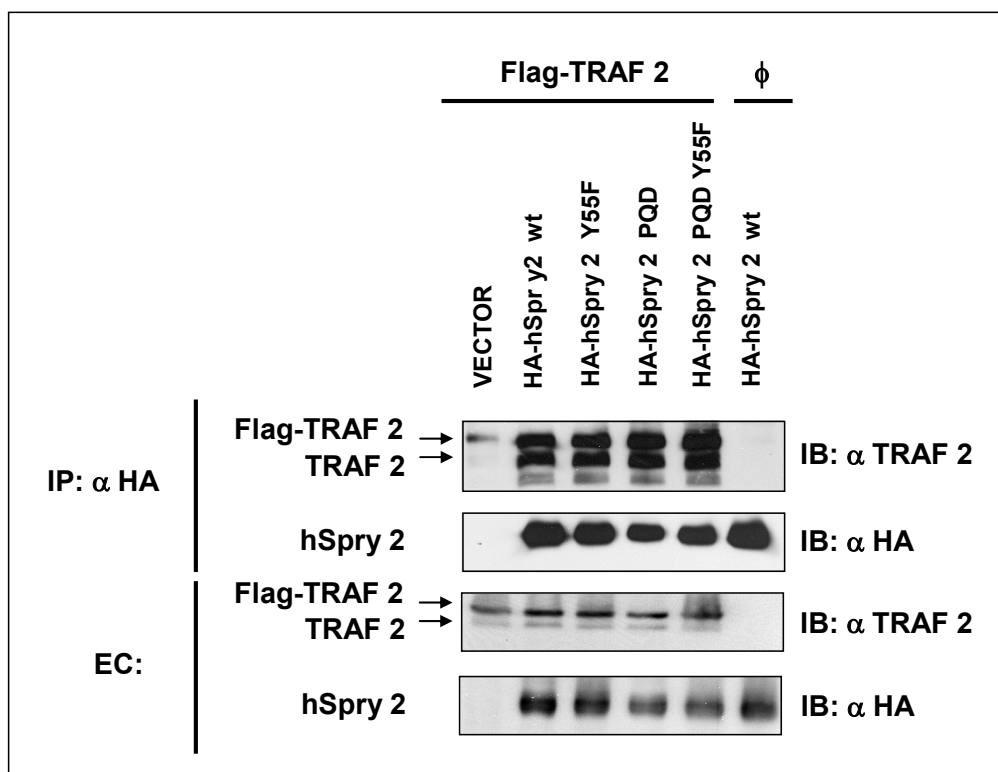


Figura 31. TRAF2 interacciona *in vivo* con hSpry2-PQD y hSpry2-PQD-Y55F. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos para las proteínas indicadas y 24 h postransfección los extractos celulares se procesaron según las indicaciones de μ MACS (Miltenyi Biotech) para inmunoprecipitar las proteínas transfectadas con el epítipo HA. Los inmunoprecipitados y una fracción de los extractos se analizaron por IB con los anticuerpos indicados. Este blot es representativo de tres ensayos independientes.

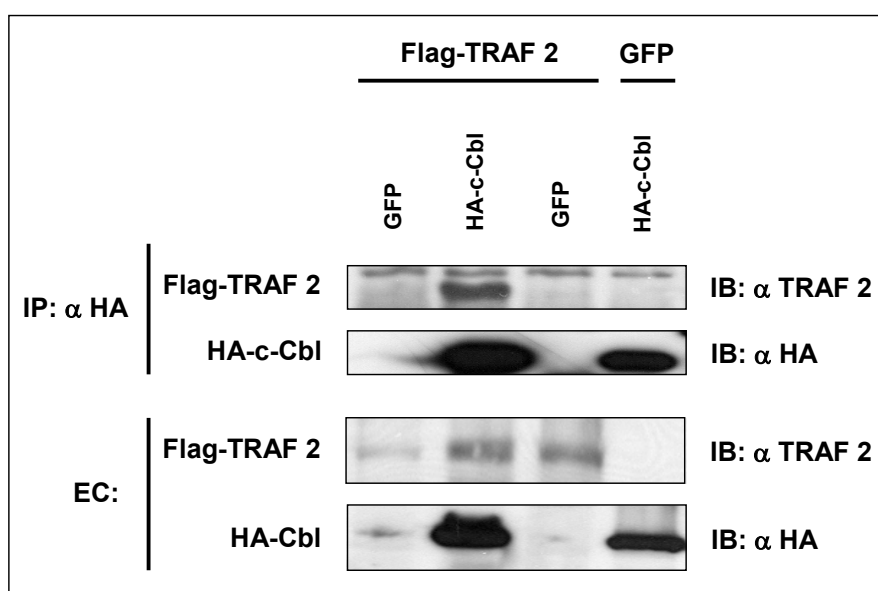


Figura 32. TRAF2 co-inmunoprecipita con c-Cbl. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para las proteínas indicadas. 24 h postransfección se evaluó la interacción entre ambas proteínas inmunoprecipitando HA-c-Cbl. Este blot es representativo de tres ensayos independientes.

Hanafusa *et al.*, 2002, Mason *et al.*, 2004) o forma estructuras de mayor número de monómeros (Wu *et al.*, 2005). Siah2, que interacciona tanto con hSpry2 (Nadeau *et al.*, 2007) como con TRAF2 (Habelhah *et al.*, 2002), cristaliza formando dímeros (Polekhina *et al.*, 2002). La afinidad de la unión de TRAF2 con otras proteínas, tanto por la secuencia consenso mayor como menor, es baja y es la avidez la que ofrece estabilidad a esta unión (Ye y Wu, 2000). El hecho de que hSpry2 sea capaz de oligomerizar, invita a pensar que su unión con TRAF2 dependa también de la oligomerización de ambas proteínas.

Puesto que c-Cbl presenta una secuencia canónica de unión a TRAF2, se estudió si ambas proteínas también interaccionaban. Para ello, se sobreexpresaron en células 293T y se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Ambas proteínas interaccionan *in vivo*, como se puede apreciar en la Figura 32. Aunque estaría por determinar si esta interacción se produce a través de la secuencia "consenso mayor" de c-Cbl. No se puede descartar, que esta unión sea a través de la propia proteína hSpry2 o de alguna otra proteína. Esta es la primera vez que se describe que TRAF2 y c-Cbl interaccionan *in vivo*.

3i. hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F INTERACCIONAN *IN VIVO* CON p65

Como las proteínas hSpry2-wt y hSpry2-Y55F interaccionan con TRAF2, es posible que hSpry2 forme parte de un complejo mayor en el que también estén presentes otras proteínas de la vía

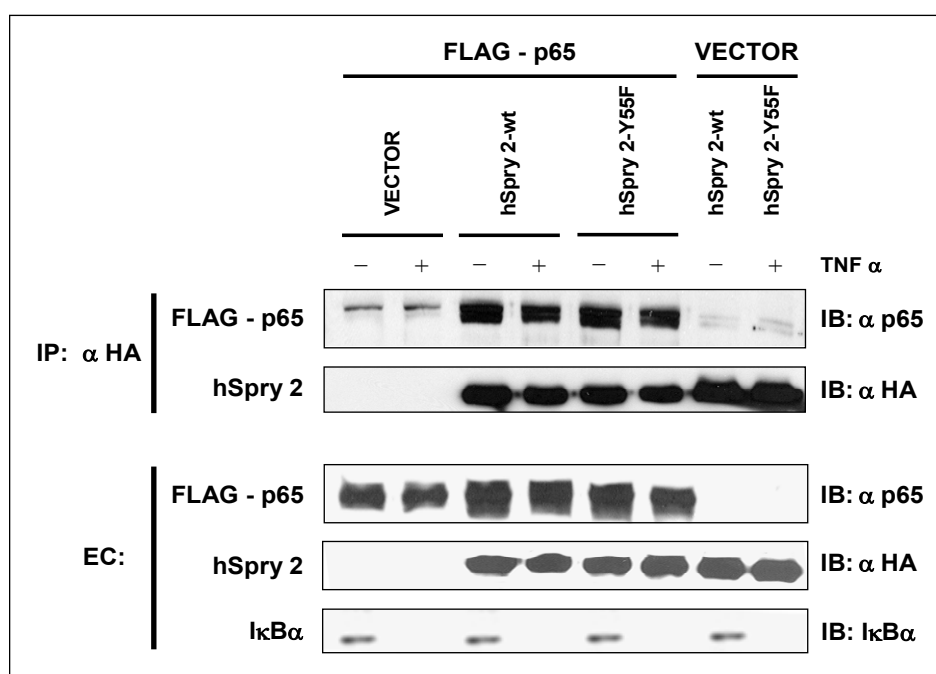


Figura 33. hSpry2-wt y hSpry2-Y55F co-inmunoprecipitan con p65. Células 293T transfectadas con los plásmidos indicados, fueron estimuladas, o no, con 50 µg/ml TNF 20 min tras 18 h de ayuno. Los extractos celulares se procesaron según las indicaciones de µMACS (Miltenyi Biotech) para inmunoprecipitar las proteínas hSpry2 con el epítipo HA. Este blot es representativo de tres ensayos independientes.

de NF- κ B. Por ello decidimos comprobar si hSpry2-wt y su mutante Y55F interaccionaban *in vivo* con p65. Los resultados muestran (Figura 33), que ambas proteínas hSpry2 co-inmunoprecipitan con p65 independientemente de la estimulación con TNF α . Aparentemente, no hay diferencias entre hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en la capacidad de interaccionar con p65, por lo que estos datos tampoco arrojan luz sobre el comportamiento distinto de ambas proteínas hSpry2 en la activación transcripcional de NF- κ B. Sin embargo, la interacción de hSpry2 con p65 abre un abanico de posibilidades sobre el papel que pueda desempeñar hSpry2 en la ruta de NF- κ B. Como los datos obtenidos por inmunofluorescencias, apuntan a que hSpry2 también se localiza en el núcleo, habría que determinar si hSpry2 interacciona con p65 en el citoplasma, en el núcleo o en ambas localizaciones, es más, puesto que hSpry2 no posee una señal de localización nuclear, es posible que sea su interacción con p65 la que facilite la localización de hSpry2 en el núcleo.

3j. LA SOBREENPRESIÓN DE hSPRY2-WT Y DE hSPRY2-Y55F EN CÉLULAS HeLa NO AFECTA A LA UNIÓN DE NF- κ B A UN SITIO CONSENSO κ B

Es posible que la activación transcripcional de NF- κ B, inducida por la sobreexpresión del mutante hSpry2-Y55F detectada por ensayos luciferasa, se refleje en un aumento de la unión de NF- κ B a los promotores con secuencias κ B. Por ello, nos planteamos si la presencia de hSpry2 afectaba a la unión de NF- κ B a sus sitios consenso por ensayos de retardo electroforético en gel (EMSA). Para ello se generaron células HeLa establemente transfectadas con pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-wt y pCEFL-KZ-AU5-hSpry2-Y55F pero sin selección clonal. Las células transfectadas con hSpry2-Y55F sobreexpresaban mayor cantidad de esta proteína que aquellas transfectadas con hSpry2-wt (Figura 34A). Se decidió emplear ambos transfectantes a pesar de la diferencia de expresión.

Extractos nucleares de estos transfectantes estables de HeLa estimulados, o no, con TNF α se emplearon en ensayos EMSA (ver Materiales y Métodos). Como se puede comprobar (Figura 34B), no existen diferencias en la unión de NF- κ B entre las células transfectadas con hSpry2-wt o hSpry2-Y55F y aquellas transfectadas con vector, ni en condiciones de ayuno ni de estimulación con TNF α .

Se comprobó si existía alguna diferencia entre los dímeros de NF- κ B que se unían a la secuencia consenso κ B cuando hSpry2-wt o hSpry2-Y55F estaban sobreexpresados. Para ello, se realizaron ensayos de súper-retardo en gel incubando las muestras con los anticuerpos anti-p65, -p50, -p52 o -RelB. La presencia de hSpry2-wt/Y55F no afecta al tipo de dímeros que se unen al oligo marcado (Figura 35). En condiciones de ayuno, la pareja de NF- κ B unida al oligo marcado es p50/p50. Este dímero es, en principio, un represor de la actividad transcripcional de NF- κ B ya que se une a los sitios κ B pero, al no poseer un dominio de transactivación, no activa

la transcripción pero sí impide la unión de otros dímeros NF- κ B activos (Franzoso *et al.*, 1992 y 1993).

En condiciones de estimulación con TNF α , el dímero que se une mayoritariamente al oligo marcado es p65/p50, un dímero transcripcionalmente activo puesto que p65 posee un dominio de transactivación. Para comprobar que las bandas obtenidas eran específicas, además del oligo marcado se incluyó el oligo sin marcar en un exceso de 40X. Como se puede comprobar, el retardo desaparece en presencia del oligo frío, lo que indica que las bandas son específicas.

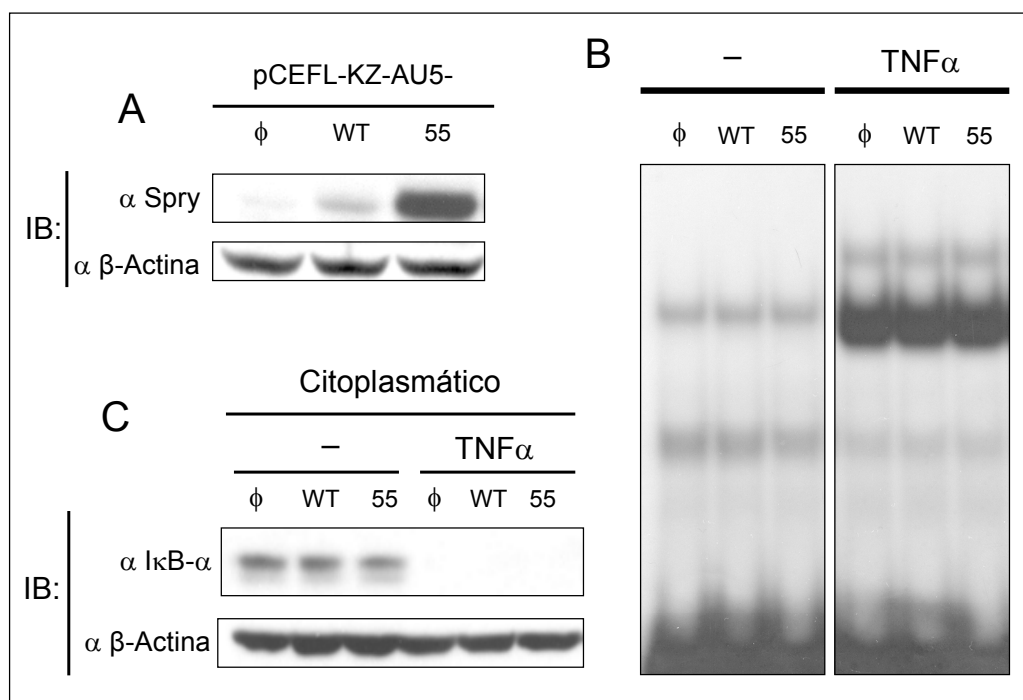


Figura 34. La sobreexpresión de hSpry2-wt o de hSpry2-Y55F en células HeLa no afecta a la unión de NF- κ B a un sitio consenso κ B. **(A)** Expresión de la proteína hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en los transfectantes estables de HeLa. Cantidades iguales de extractos totales de HeLa se analizaron por IB. (ϕ): vector. **(B)** EMSA de los extractos nucleares de los transfectantes estables. 6 μ g de los extractos nucleares de las células estimuladas, o no, con 50 ng/ml TNF α durante 20 min, se emplearon en ensayos EMSA con un oligo con una secuencia consenso κ B (ver Materiales y Métodos). Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes. **(C)** Degradación de I κ B α . La degradación de I κ B α y la expresión de β -actina en los extractos citoplasmáticos de las células empleadas en el apartado (B), se

Estos resultados no explican los datos obtenidos con los ensayos luciferasa. Los ensayos luciferasa miden la activación transcripcional mientras que los ensayos EMSA evalúan la unión o no de NF- κ B a un sitio consenso κ B. Sin unión del factor de transcripción no se puede dar la activación transcripcional, pero la unión del mismo no necesariamente implica activación. La estimulación continua con TNF α de un cultivo celular provoca una oscilación en la activación de NF- κ B, es decir, se producen ciclos sucesivos de degradación de I κ B/liberación de NF- κ B/translocación al núcleo y resíntesis de I κ B /down-regulación de NF- κ B, ciclos que a lo largo

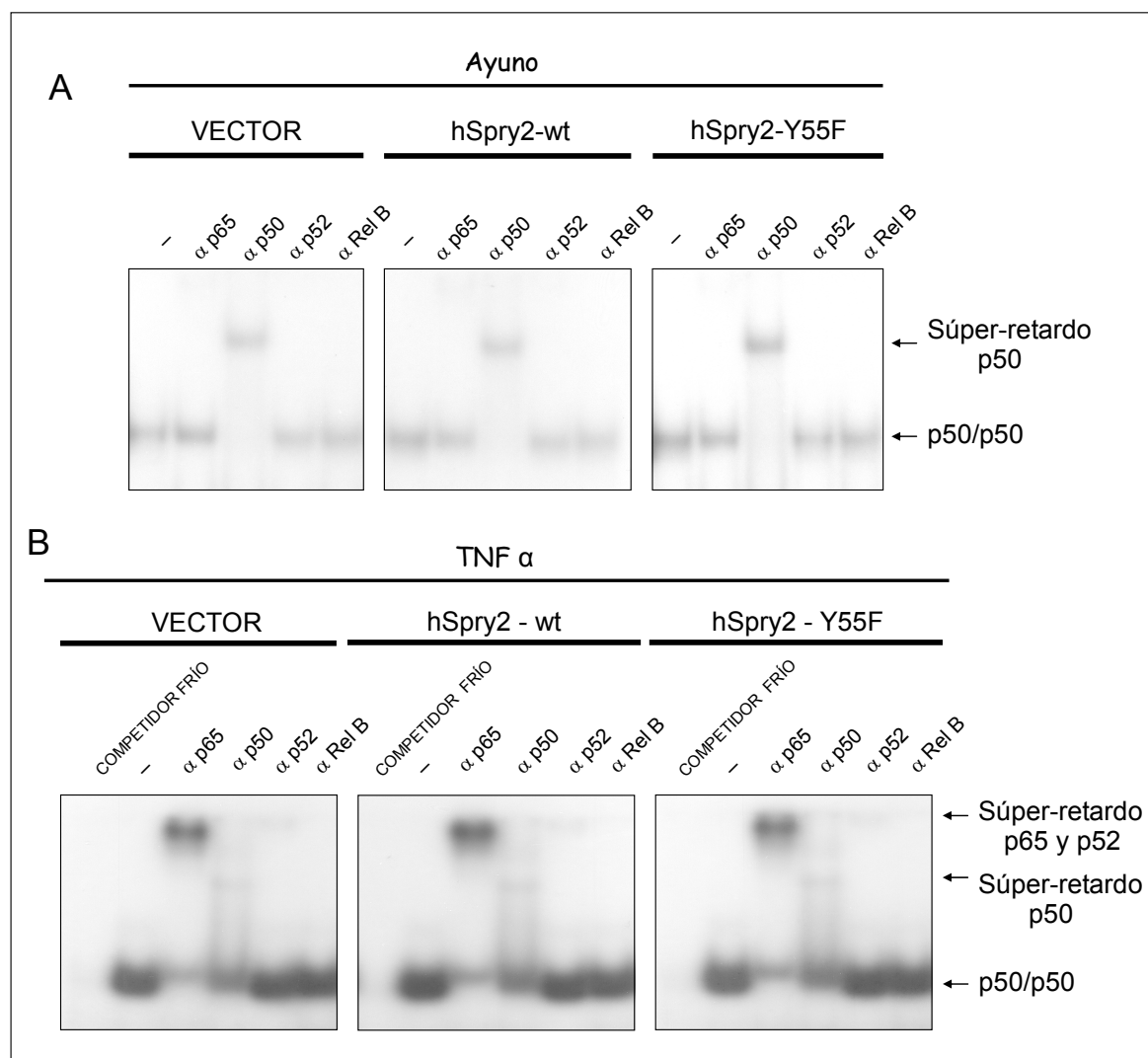


Figura 35. La sobreexpresión de hSpry2-wt o de hSpry2-Y55F en células HeLa no afecta a la naturaleza de los dímeros de NF-κB que se unen a los sitios consenso κB. Los extractos nucleares de las células HeLa transfectadas establemente con hSpry2-wt, hSpry2-Y55F o vector (ϕ) fueron utilizados en ensayos de súper-retardo en gel (ver Materiales y Métodos). **(A)** Extractos nucleares de células sin estimular. **(B)** Extractos nucleares de células estimuladas con 50 ng/ml TNFα 20 min.

del tiempo se van volviendo asincrónicos en la población celular estimulada (Nelson *et al.*, 2004). La activación de NF-κB por la sobreexpresión de hSpry2-Y55F no se producirá de forma simultánea en todas las células, sino a medida que la proteína se vaya expresando, al contrario de lo que ocurre cuando se añade TNFα al cultivo celular, en el que todas las células son estimuladas simultáneamente. Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión de hSpry2-Y55F active de forma cíclica la actividad transcripcional de NF-κB de la misma manera que lo hace la estimulación sostenida con TNFα. De ser así, y puesto que los ensayos luciferasa miden la acumulación de la proteína del gen reportero a lo largo del tiempo de estimulación, sería esperable que dicha activación fuese fácilmente registrada con ensayos luciferasa.

Por otro lado, los ensayos EMSA miden la translocación de NF- κ B al núcleo y su unión a la sonda radiactiva, fenómeno que es muy fácil de observar cuando las células se estimulan simultáneamente con un fuerte estímulo de NF- κ B como TNF α . En el caso de las células que sobreexpresan hSpry2-Y55F, la activación de NF- κ B, que es muy inferior a la que se obtiene en ensayos luciferasa tras la estimulación con TNF α , no estará sincronizada en todas las células, lo que sumado al hecho de que esta activación es débil, no es sorprendente que no se observe una mayor unión en este caso en los ensayos EMSA.

Por otro lado, como muestran nuestros resultados (Figura 34), aunque la activación de NF- κ B por TNF α y la sobreexpresión de hSpry2-Y55F es sinérgica en ensayos luciferasa, tampoco se observan diferencias en condiciones de estimulación en los ensayos EMSA. Las posibles explicaciones descritas para el caso del ayuno también pueden aplicarse en este caso. No obstante, el papel de hSpry2-Y55F no necesariamente tiene que ser el mismo en condiciones de ayuno y de estimulación por TNF α , podría ocurrir que en condiciones de estimulación, la presencia de hSpry2-Y55F medie la fosforilación u otra modificación de los dímeros de NF- κ B o de aquellas proteínas necesarias para la activación de la transcripción.

3k. LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2 Y DE hSPRY2-Y55F EN CÉLULAS SW480-ADH, SÍ AFECTA A LA NATURALEZA DE LOS DÍMEROS NF- κ B QUE SE UNEN A UN SITIO CONSENSO κ B

La línea celular SW480 fue establecida en 1976 de un adeno-carcinoma primario humano (Leibovitz *et al.*, 1976). Es una de las líneas celulares de cáncer colo-rectal mejor caracterizadas, en la que se han descrito dos poblaciones con morfología y respuesta hormonal distinta: SW480-ADH (adherentes) y SW480-R (redondeadas); siendo las redondeadas altamente tumorigénicas en ratones atímicos en comparación con las adherentes (Pálmer *et al.*, 2001). Estudios de expresión de ambas líneas celulares han establecido una clara diferencia en la expresión endógena de hSpry2, siendo mayor su expresión en las SW480-R (Pálmer *et al.*, 2003). Por todo ello, se eligió este modelo celular para estudiar los efectos de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en la vía de NF- κ B. Se generaron líneas SW480-ADH establemente transfectadas con pCEFL-KZ-hSpry2-wt, pCEFL-KZ-hSpry2-Y55F o vector vacío, sin hacer selección clonal. De nuevo, las células transfectadas con hSpry2-wt expresaban menor cantidad de esta proteína que aquellas transfectadas con hSpry2-Y55F (Figura 36A).

Primero, se analizó si la presencia de hSpry2, afectaba a la unión de NF- κ B a sus secuencias consenso por ensayos EMSA, utilizando extractos nucleares de estos transfectantes estables de SW480-ADH estimulados, o no, con TNF α (Figura 36B). Cabe destacar que el patrón de bandas retardadas que se obtienen en ensayos de EMSA en estas células es similar tanto en condiciones de ayuno como de estimulación con TNF α y lo que varía es la intensidad de las

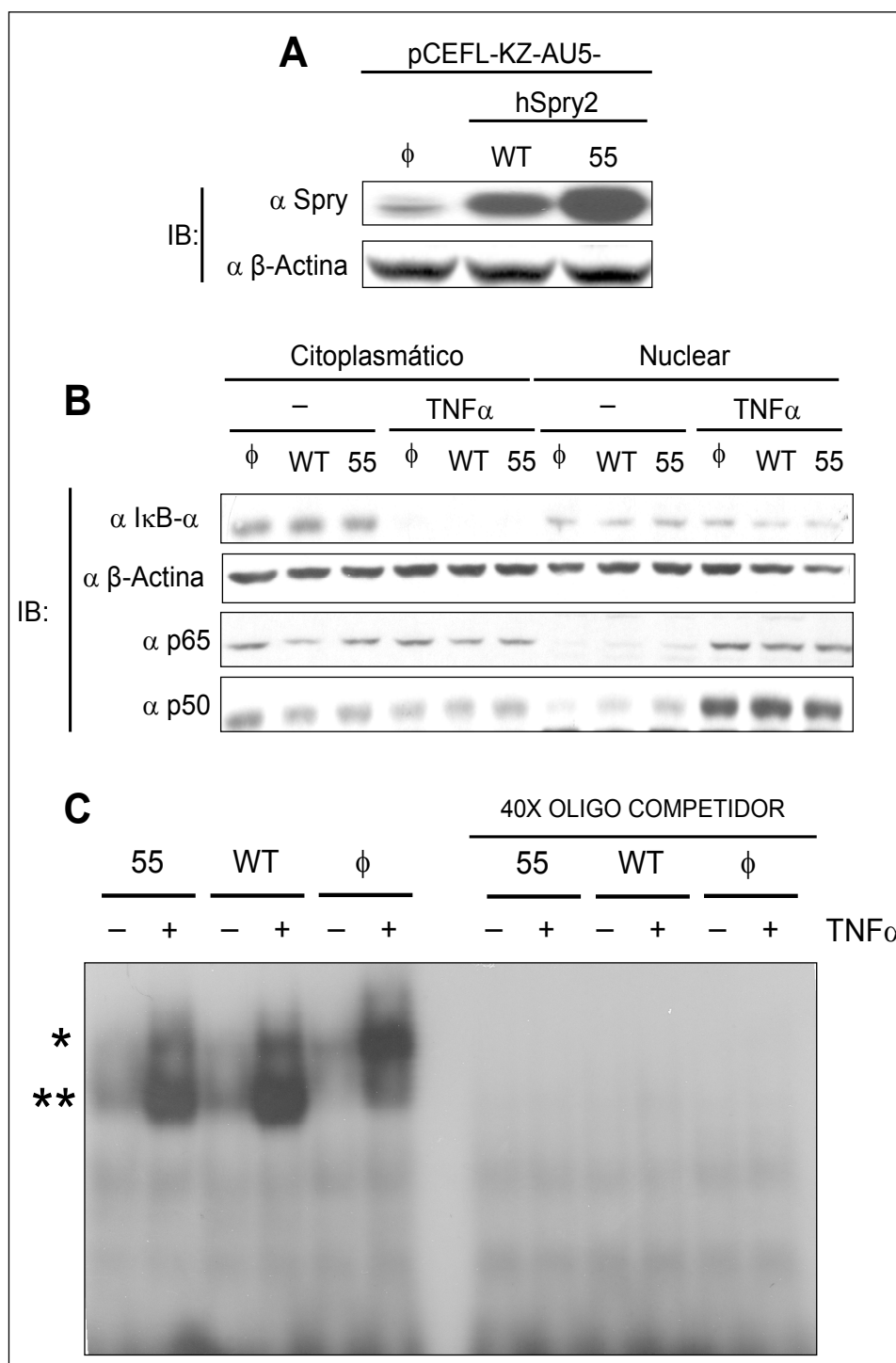


Figura 36. La sobreexpresión de hSpry2-wt o de hSpry2-Y55F en células SW480-ADH sí afecta a la unión de NF-κB a una secuencia consenso κB. **(A)** Expresión de la proteína hSpry2-wt y hSpry2-Y55F en los transfectantes estables de SW480-ADH. Cantidades iguales de extractos totales se analizaron por IB. (ϕ): vector. **(B)** Degradación de IκBα en los extractos citoplasmáticos y distribución de p50 y p65. IB de 30 µg de extractos nucleares y citoplasmáticos de las células estimuladas o no con 50 ng/ml TNFα durante 20 min. **(C)** Ensayos EMSA. 10 µg de los extractos nucleares utilizados en el ensayo del apartado (B) se emplearon en ensayos EMSA con un oligo con un sitio consenso κB (ver Materiales y Métodos). Las muestras de la derecha se incubaron con oligo frío antes de añadir el oligo marcado. Están señaladas con asteriscos, las dos bandas retardadas que aparecen y que difieren en su intensidad cuando hSpry2-wt o Y55F están sobreexpresados. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

mismas. Ya se ha descrito, que las células SW480, que tienen mutaciones oncogénicas de Ras (Trainer *et al.*, 1988), poseen una activación constitutiva de NF- κ B (Agarwal *et al.*, 2005; Voboril y Weberova-Voborilova, 2006). Como se puede comprobar en estos ensayos (Figura 36C), en este modelo celular sí existen diferencias entre las bandas retardadas cuando las células están transfectadas con hSpry2-wt o hSpry2-Y55F respecto a cuando lo están con vector. Cuando las proteínas hSpry2 están sobreexpresadas, la banda más intensa es la banda de mayor movilidad [(**) Figura 36C], mientras que en las células transfectadas con vector, la banda más intensa es la más retrasada [(*) Figura 36C]. Estos datos muestran que la presencia de hSpry2-wt/Y55F sí afecta a la naturaleza de los dímeros NF- κ B que se unen a la secuencia consenso κ B en este tipo celular.

Por ello estudiamos la naturaleza de los dímeros NF- κ B que se unían a la sonda, para lo que se realizaron ensayos de súper-retardo en gel. La composición de parejas de NF- κ B que se detectan por ensayos EMSA en este tipo celular, es mucho más compleja que en células HeLa, debido a ello es difícil asegurar cuál es la composición de las bandas (A) y (B) (Figura 37), puesto que no en todas las ocasiones es fácil diferenciar una banda de súper-retardo con una banda de retardo. No obstante, se puede concluir, que mayoritariamente la banda de retardo (A) está formada principalmente por dímeros p65/p65 aunque también contiene dímeros p65/RelC, mientras que la banda (B), que contiene al menos dos bandas que no hemos conseguido separar, contiene dímeros que incluyen p65 mayoritariamente, siendo el dímero más abundante p65/p50 seguido de p65/RelC. Sin embargo, la ausencia de diferencias entre el súper-retardo de las células transfectadas con hSpry2-wt y hSpry2-Y55F no ayuda a explicar la distinta capacidad activadora de NF- κ B entre ambas proteínas por ensayos luciferasa en células HeLa.

Por lo tanto en las células SW480-ADH, la presencia de hSpry2-wt y hSpry2-Y55F favorece la formación de dímeros p65/p50 frente a p65/p65. Es posible, que en células y/o con estímulos en los que el dímero mayoritario de NF- κ B que se activa sea la pareja p65/p50, la sobreexpresión de hSpry2-wt/Y55F altere la composición de los dímeros. Las proteínas hSpry2 no son las únicas cuya sobreexpresión afecta a la composición de dímeros NF- κ B activados. La sobreexpresión de la proteína miotrofina/V-1 favorece la formación de dímeros p65/p65 y p50/p50 en detrimento de los p65/p50 (Knuefermann *et al.*, 2002). Esta proteína cuya localización es mayoritariamente citoplasmática aunque también está presente en el núcleo, interacciona y se co-transloca al núcleo con p65 (Das *et al.*, 2008). hSpry2-wt/Y55F también parecen tener una localización parcialmente nuclear (Figura 25) y también interaccionan con p65 (Figura 33).

El homodímero p65/p65 ha sido descrito como un inhibidor transcripcional (Guttridge, *et al.*, 2000; Nagarajan *et al.*, 2000), pero también como un activador (Marui *et al.*, 2005; Ritchie *et al.*, 2004). Es posible que los dímeros p65/p65 y p65/p50 se unan/activen preferentemente a

promotores distintos en células SW480-ADH como ya se ha descrito para otros dímeros NF- κ B (Ritchie *et al.*, 2004; Kunsch *et al.*, 1992; Leung *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2003). De ser así, hSpry2 estaría seleccionando qué genes, dependientes de NF- κ B, se estarían activando transcripcionalmente en células SW480-ADH.

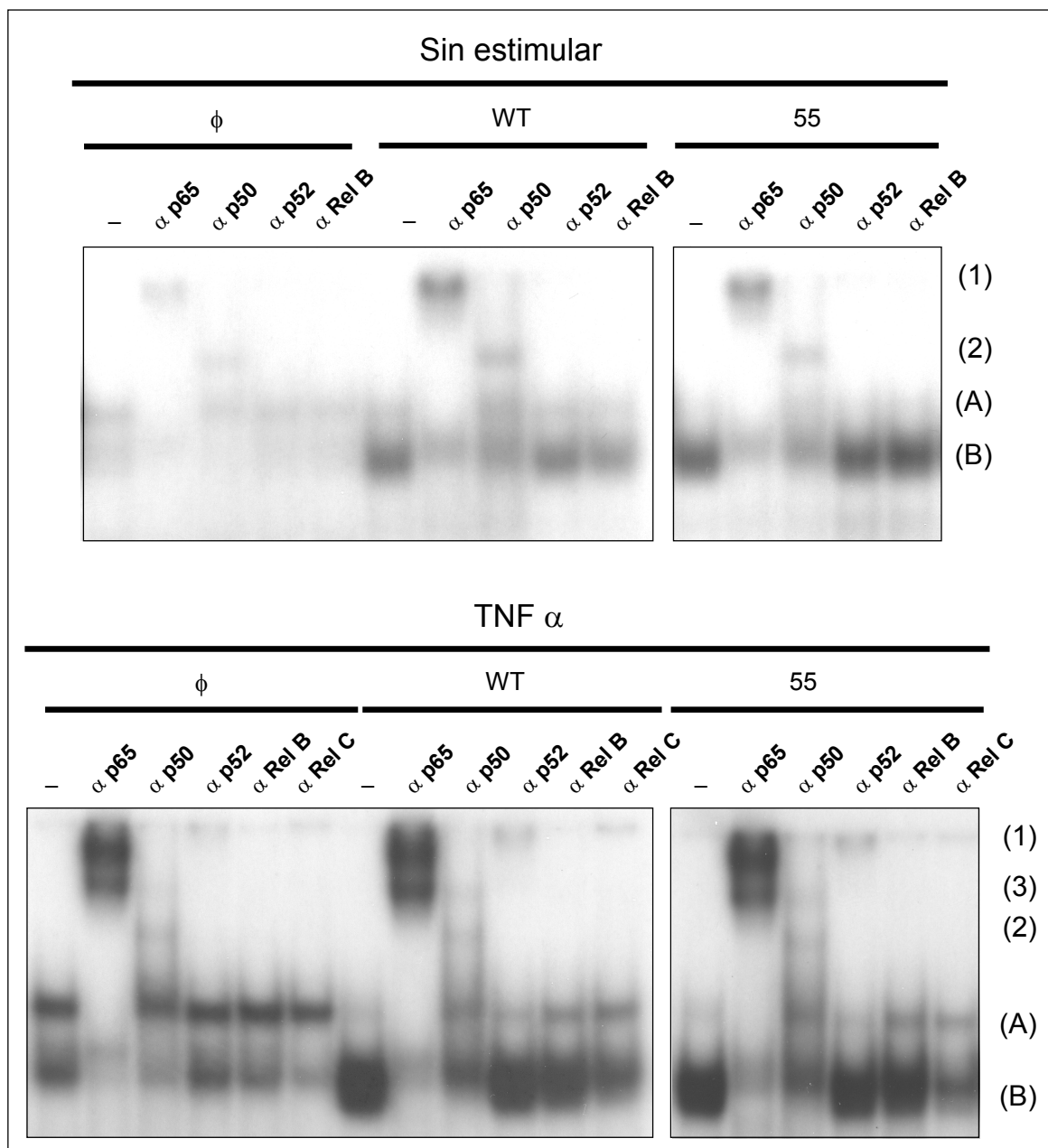


Figura 37. La sobreexpresión de hSpry2-wt o de hSpry2-Y55F en células SW480-ADH afecta a la naturaleza de los dímeros NF- κ B que se unen a los sitios consenso κ B. Los extractos nucleares de las células SW480-ADH transfectadas establemente con hSpry2-wt, hSpry2-Y55F o vector (ϕ) fueron utilizados en ensayos de súper-retardo en gel (ver Materiales y Métodos). Extractos nucleares de células sin estimular (panel superior) o estimuladas con 50 ng/ml TNF α (panel inferior). Los números a la derecha de ambos paneles indican las bandas retardadas: (1) súper-retardo de p65 mayoritariamente, pero también de p50, p52 y RelB; (2) súper-retardo de p50; (3) súper-retardo de p65 y p50; (A) y (B) señalan la altura a la que las bandas sin súper-retardo aparecen. Estos ensayos son representativos de tres experimentos independientes.

31. LA SOBREEXPRESIÓN DE hSPRY2-Y55F TAMBIÉN AFECTA A LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B EN CÉLULAS SW480-ADH

Se quiso corroborar, que el mutante Y55F de hSpry2 tenía efectos en la activación transcripcional de NF- κ B en las células SW480-ADH, tal y como ocurre en células HeLa. Como se muestra en los ensayos luciferasa de la Figura 38, la activación que produce el TNF α en estas células es muy débil en comparación con los valores que se obtienen para HeLa. Los valores absolutos de inducción de Luciferasa/Renilla son altos de por sí, incluso en las células SW480-ADH sin estimular transfectadas con vector (datos no mostrados), lo que probablemente es debido a la activación constitutiva de NF- κ B en este tipo celular ya descrita en la bibliografía (Agarwal *et al.*, 2005; Voboril y Weberova-Voborilova, 2006). De hecho, en los ensayos EMSA de estas células, los dímeros NF- κ B que se unen a la sonda en ausencia de estimulación o tras la estimulación con TNF α son los mismos (Figura 36C), aunque la intensidad de las bandas retardadas es muy diferente.

Es llamativo, que a pesar de la poca activación en ensayos luciferasa que el TNF α produce en estas células, la diferencia entre las intensidades de las bandas retardadas que se observan por ensayos EMSA sean tan marcadas y, además, de dímeros NF- κ B que en principio son transcripcionalmente activos (Figura 36C). Podría estar ocurriendo, que la activación constitutiva sea lo suficientemente alta como para saturar los ensayos luciferasa o que, incluso, no haya suficientes co-activadores disponibles para la activación del gen promotor. Estos resultados indican, que en estas células, el TNF α inicia todos los mecanismos necesarios para la activación de NF- κ B, que incluyen la degradación del I κ B α (Figura 36B), la translocación de NF- κ B al núcleo y la unión a las secuencias consenso κ B (Figura 36C), no obstante, esto no se refleja en la activación transcripcional de NF- κ B por ensayos luciferasa.

Aunque no existe una relación clara entre la secuencia del sitio κ B y los dímeros que se unen a la misma (Chen-Park *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 1992), los sitios κ B en los promotores para los genes para una determinada proteína están muy conservados entre especies (Hoffmann *et al.*, 2003). Así los promotores de los genes para MCP-1 e IL-10 difieren en un nucleótido de una secuencia de 10 que forman su sitio κ B (Hoffmann *et al.*, 2003), sin embargo la transcripción del primero no requiere de la presencia de p50 mientras que la del segundo sí. Estos datos apuntan a que no todos los dímeros NF- κ B son capaces de activar todos los promotores con sitios κ B, por lo que es posible, que nuestro gen reportero no sea el adecuado para detectar la activación transcripcional de NF- κ B en las células SW480-ADH.

No obstante, sí existe una leve activación transcripcional de NF- κ B cuando el mutante hSpry2-Y55F se sobreexpresa (Figura 38), que es más notable en condiciones de estimulación con TNF α . Teniendo en cuenta la baja activación de NF- κ B que promueve el TNF α , podemos

decir que la sobreexpresión de hSpry2-Y55F produce una activación que, aunque cuantitativamente es pequeña, es significativa.

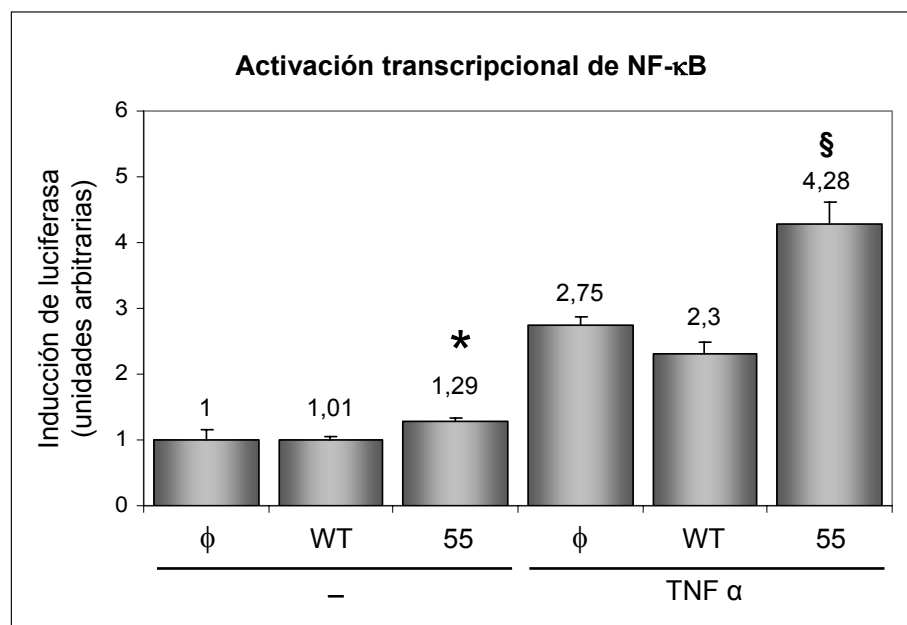


Figura 38. La sobreexpresión de hSpry2-Y55F en células SW480-ADH afecta a la activación transcripcional de NF-κB. Células SW480-ADH, establemente transfectadas con vector (φ), hSpry2-wt o hSpry2-Y55F fueron transfectadas con los plásmidos de NF-κB-Luc y renilla (ver Materiales y Métodos). Tras 18 h privadas de suero, fueron estimuladas, o no, con 50 ng/ml TNFα durante 5h. Los datos obtenidos se representan normalizados respecto al obtenido para las células transfectadas con vector y sin estimular. [*p<0,05 vs células transfectadas con vector y sin estimular (test-t); \$ p<0,01 vs células transfectadas con vector y estimuladas con TNFα (test-t)]. Este histograma es representativo de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Es posible que hSpry2-wt inhiba/module la activación transcripcional de NF-κB en distintos puntos de la vía. El hecho de que hSpry2-wt interaccione con p65 y con TRAF2, una proteína fundamental en la ruta de activación de NF-κB, y que la cantidad de proteína hSpry2-wt esté regulada por TNFα (Ding y Warburton, 2008), sugieren un papel de hSpry2-wt en esta vía. El procesamiento de pre-TNFα a TNFα libre está mediado por la proteasa TACE2 (Black *et al.*, 1997), cuya activación está regulada por ERK en macrófagos activados por LPS (Rousseau *et al.*, 2008). Es posible que la sobreexpresión de hSpry2-Y55F active ligeramente la activación de ERK y que ello regule el procesamiento de pre-TNFα. También podría ocurrir que hSpry2-Y55F facilite la oligomerización de TRAF2 y del complejo proteico necesario para que se inicie la activación de NF-κB. El por qué el mutante Y55F de hSpry2 lo haría y la forma wt no, esta aún por dilucidar. También es posible, que hSpry2-wt no influya en la activación de NF-κB, pero sí module qué dímeros de NF-κB se están activando y, por lo tanto, qué genes dependientes de NF-κB se están expresando en respuesta a TNFα u otros estímulos, de hecho los niveles de proteína hSpry2 están controlados por factores de crecimiento como el EGF o el FGF (Sasaki *et*

et al., 2001, Rubin *et al.*, 2005), así como por TGF β (Ding *et al.*, 2007) y por el propio TNF α (Ding y Warburton, 2008).

En los últimos años se está profundizando en la importancia que la compartimentalización subcelular tiene en la transducción de señales. El TNFRI activado es endocitado y, al igual que lo que ocurre con otros receptores, es capaz de señalizar desde los endosomas, aunque aparentemente, el TNFRI inicia distintas vías de señalización cuando está en membrana plasmática o en endosomas (Schneider-Brachert *et al.*, 2004 y 2006; Pober *et al.*, 2005). Así desde la membrana plasmática activa NF- κ B, mientras que desde los endosomas tempranos activa la vía apoptótica. Se ha descrito, que hSpry2 media la activación sostenida de ERK inducida por EGF, puesto que retrasa la transición endosoma-temprano/endosoma-tardío del EGFR (Kim *et al.*, 2007a). Dado que mSpry2 disminuye los efectos apoptóticos de TNF α en fibroblastos murinos (Ding y Warburton, 2008), cabe la posibilidad de que Spry2 dificulte la endocitosis o algún otro paso en la internalización del TNFRI, mimetizando los efectos que tiene sobre el EGFR.

Son muchas las preguntas que quedan por responder. Puesto que hSpry2 es un inhibidor de ERK, una pregunta inmediata a contestar, es el efecto que hSpry2 tiene en la vía de las MAPKs tras la estimulación con TNF α . Por otro lado, se podían utilizar inhibidores químicos o dominantes negativos que actúen por encima de I κ B α para determinar en qué punto de la vía de activación de NF- κ B está actuando hSpry2-Y55F. Sería interesante saber, si hSpry2 influye en la activación de NF- κ B cuando ésta es inducida por otros receptores de la superfamilia de TNF α . Se debería averiguar si en células SW480-ADH transfectadas con hSpry2, el patrón de genes que se activan es diferente en respuesta a TNF α y en condiciones de no estimulación, en comparación con células transfectadas con vector. Así se verificaría, que la diferencia en los dímeros NF- κ B que se activan cuando hSpry2 está sobreexpresado, efectivamente afectan a la selección de genes con sitios κ B que se están expresando. Otro efecto que se podría comparar, es la susceptibilidad a la apoptosis entre células transfectadas con vector o hSpry2.

En esta tesis se han estudiado las rutas de señalización de dos mediadores de la respuesta inflamatoria, PGA₁ y TNF α . Se ha comprobado que PGA₁ une y activa a H-, N- y K-Ras. 15dPGJ₂ es considerada mayoritariamente como una prostaglandina antiinflamatoria y antitumoral, no obstante la formación de papilomas inducidos con DMBA y TPA en ratones, es mayor cuando se emplea esta prostaglandina (Millán *et al.*, 2006). Es posible que la activación de Ras por PGA₁ tenga efectos similares a los de 15dPGJ₂ en este modelo experimental. En este trabajo también se ha constatado que la activación de ERK inducida por PGA₁ es inhibida por hSpry2. Esta observación abre el abanico de estímulos cuya activación de ERK están afectados por hSpry2.

También se ha estudiado la implicación de hSpry2 en la vía de NF- κ B. hSpry2 debería tener propiedades antitumorales puesto que inhibe la proliferación celular al inhibir ERK, y esto es lo que sugiere el hecho de que la expresión de hSpry2 esté disminuída en tumores de mama y pulmón y en linfomas B difusos (Sutterlüty *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2008). Pero hSpry2 está sobreexpresado en otros tumores como en melanomas (Bloethner *et al.*, 2005). Este efecto puede ser debido a la activación constitutiva de ERK, como es el caso de melanomas que presentan B-Raf oncogénico (Tsavachidou *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2002), pero tal vez, hSpry2 no sea un actor pasivo en el proceso tumorigénico, y su influencia sobre la vía de NF- κ B sea también importante en la progresión tumoral.

Conclusiones



- I.** LA PROSTAGLANDINA CICLOPENTENONA PGA_1 FORMA ADUCTOS DE MICHAEL CON H-RAS.
- II.** ESTA UNIÓN COVALENTE SE PRODUCE CON UNA ESTEQUIOMETRÍA 3:1, Y AFECTA A LAS CISTEÍNAS 118, 181 Y 184, SIENDO MODIFICADA MAYORITARIAMENTE LA CISTEÍNA 118.
- III.** LA UNIÓN DE PGA_1 PROVOCA LA ACTIVACIÓN DE H-RAS Y LA MUTACIÓN DE LA CISTEÍNA 118 DISMINUYE DE FORMA MARCADA DICHA ACTIVACIÓN.
- IV.** hSPRY2 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK/ELK1 INDUCIDA POR PGA_1 .
- V.** hSPRY2 NO AFECTA A LA ACTIVACIÓN DE RAS INDUCIDA POR PGA_1 .
- VI.** LA SOBREENPRESIÓN DEL MUTANTE hSPRY2-Y55F AUMENTA LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B.
- VII.** hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F INTERACCIONAN *IN VIVO* CON LAS PROTEÍNAS TRAF2 Y p65.
- VIII.** LA SOBREENPRESIÓN DE hSPRY2-WT Y hSPRY2-Y55F NO AFECTA A LOS DÍMEROS NF- κ B QUE SE DETECTAN POR ENSAYOS DE EMSA EN CÉLULAS HeLa, PERO SÍ EN CÉLULAS SW480-ADH.

Bibliografía



- Adhikari A., Xu M. y Chen Z.J. (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. **26**(22):3214-2326.
- Agarwal A., Das K., Lerner N., Sathe S., Cicek M., Casey G. y Sizemore N. (2005) The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene*. **24**(6):1021-1031.
- Aggarwal B.B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**(9):745-756.
- Albensi B.C. y Mattson M.P. (2000) Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*. **35**(2):151-159.
- Aldini G., Carini M., Vistoli G., Shibata T., Kusano Y., Gamberoni L., Dalle-Donne I., Milzani A. y Uchida K. (2007) Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry*. **46**(10):2707-2718.
- Alessi D.R., Deak M., Casamayor A., Caudwell F.B., Morrice N., Norman D.G., Gaffney P., Reese C.B., MacDougall C.N., Harbison D., Ashworth A. y Bownes M. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**(10):776-789.
- Alexandrova A.Y., Kopnin P.B., Vasiliev J.M. y Kopnin B.P. (2006) ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell. Res.* **312**(11):2066-2073.
- Amici C., Belardo G., Rozera C., Bernasconi D. y Santoro M.G. (2004) Inhibition of herpesvirus-induced HIV-1 replication by cyclopentenone prostaglandins: role of Ikb kinase (IKK). *AIDS*. **18**(9):1271-1280.
- Arenzana-Seisdedos F., Fernandez B., Dominguez I., Jacqué J.M., Thomas D., Diaz-Meco M.T., Moscat J. y Virelizier J.L. (1993) Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J. Virol.* **67**(11):6596-6604.
- Arikawa E., Cheung C., Sekirov I., Battell M.L., Yuen V.G. y McNeill J.H. (2006) Effects of endothelin receptor blockade on hypervasoreactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**(8-9):823-833.
- Arozarena I., Matallanas D., Berciano M.T., Sanz-Moreno V., Calvo .F, Muñoz M.T., Egea G., Lafarga M. y Crespo P. (2004) Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Cell. Biol.* **24**(4):1516-1530.
- Ashburner B.P., Westerheide S.D. y Baldwin A.S. Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell Biol.* **21**(20):7065-7077.

- Ashkenazi A. y Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281** (5381):1305-1308.
- Bache K.G., Slagsvold T. y Stenmark H. (2004) Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J.* **23**:2707-2712.
- Bachelier F., Alcamí J., Arenzana-Seisdedos F. y Virelizier J.L. (1991) HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa B induction on infection of monocytes. *Nature*. **350**(6320):709-712.
- Baker T.L., Booden M.A. y Buss J.E. (2000) S-Nitrosocysteine increases palmitate turnover on Ha-Ras in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **275**(29):22037-22047.
- Balmain A., Ramsden M., Bowden G.T. y Smith J. (1984) Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*. **307**(5952):658-660.
- Banner D., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H-J, Broger C., Loetscher H. y Lesslauer W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55kd TNF receptor-human TNF- β complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell*. **73**(3):431-445.
- Bargou R.C., Emmerich F., Krappmann D., Bommert K., Mapara M.Y., Arnold W., Royer H.D., Grinstein E., Greiner A., Scheidereit C. y Dörken B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* **100**(12):2961-2969.
- Bassères D.S. y Baldwin A.S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. **25**(51):6817-6830.
- Baud V., Liu Z.G., Bennett B., Suzuki N., Xia Y. y Karin M. (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* **13**(10):1297-1308.
- Bergman M.R., Kao R.H., McCune S.A. y Holycross B.J. (1999) Myocardial tumor necrosis factor-alpha secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am. J. Physiol.* **277**(2 Pt 2):H543-550.
- Biswas D.K., Dai S.C., Cruz A., Weiser B., Graner E. y Pardee A.B. (2001) The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(18):10386-10391.
- Bivona T.G., Quatela S.E., Bodemann B.O., Ahearn I.M., Soskis M.J., Mor A., Miura J., Wiener H.H., Wright L., Saba S.G., Yim D., Fein A., Pérez de Castro I., Li C., Thompson C. B., Cox A.D. y Philips M.R. (2006) PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bel-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell*. **21**(4):481-493.
- Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J. y Cerretti D.P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. **385**(6618):729-733.
- Blankenberg S., Barbaux S. y Tiret L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **170**(2):191-203.

- Blanquart C., Barbier O., Fruchart J.C., Staels B. y Glineur C. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **85**(2-5):267-273.
- Bloethner S., Chen B., Hemminki K., Müller-Berghaus J., Ugurel S., Schadendorf D, Kumar R. (2005) Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis*. **26**(7):1224-1232.
- Boriack-Sjodin P.A., Margarit S.M., Bar-Sagi D. y Kuriyan J.(1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*. **394**(6691):337-343.
- Bos C.L., Richel D.J., Ritsema T., Peppelenbosch M.P.y Versteeg H.H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**(7):1187-1205.
- Bours V., Franzoso G., Azarenko V., Park S., Kanno T., Brown K. y Siebenlist U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. **72**(5):729-739.
- Bulló M., García-Lorda P., Peinado-Onsurbe J., Hernández M., Del Castillo D., Argilés J.M. y Salas-Salvadó J. (2002) TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **26**(5):652-658.
- Bureau F., Desmet C., Mélotte D., Jaspar F., Volanti C., Vanderplasschen A., Pastoret P.P., Piette J. y Lekeux P. (2002) A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *J. Immunol.* **168**(10):5318-5325.
- Busch L.K. y Bishop G.A. (2001) Multiple carboxyl-terminal regions of the EBV oncoprotein, latent membrane protein 1, cooperatively regulate signaling to B lymphocytes via TNF receptor-associated factor (TRAF)-dependent and TRAF-independent mechanisms. *J. Immunol.* **167**(10):5805-5813.
- Cabrita M.A. y Christofori G. (2008) Sprouty Proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis*. **11**(1):53-62.
- Cabrita M.A., Jäggi F., Widjaja S.P. y Christofori G. (2006) A functional interaction between sprouty proteins and caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **281**(39):29201-29212.
- Campbell P.M. y Der C.J. (2004) Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer. Biol.* **14**(2):105-114.
- Carpenter C.L. y Cantley L.C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**(2):153-158.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N. y Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**(9): 3666–3670.
- Carthew R.W. y Rubin G.M. (1990) seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye. *Cell* **63**(3):561-577.
- Casci T., Vinós J. y Freeman M. (1999) Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*. **96**(5):655-665.

- Castaños-Vélez E., Maerlan S., Osorio L.M., Aberg F., Biberfeld P., Orn A. y Rottenberg M.E. (1998) Trypanosoma cruzi infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect. Immun.* **66**(6):2960-2968.
- Castrillo A., Díaz-Guerra M.J., Hortelano S., Martín-Sanz P. y Boscá L. (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **20**(5):1692-1698.
- Cernuda-Morollón E., Pineda-Molina E., Cañada F.J. y Pérez-Sala D. (2001) 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* **276**(38):35530-35536.
- Chadee D.N., Yuasa T. y Kyriakis J.M. (2002) Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adapter protein TRAF2. *Mol. Cell Biol.* **22**(3):737-749.
- Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L. y Lenardo M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* **288**(5475):2351-2354.
- Chen D., Waters S.B., Holt K.H. y E. Pessin E. (1996) SOS Phosphorylation and Disassociation of the Grb2-SOS Complex by the ERK and JNK Signaling Pathways. *J. Biol. Chem* **271**(11):6328-6332.
- Chen Lf., Fischle W., Verdin E, y Greene W.C. (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science.* **293**(5535):1653-1657.
- Chen Z.J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* **7**(8):758-765.
- Cheng G., Cleary A.M., Ye Z.S., Hong D.I., Lederman S. y Baltimore D. (1995) Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science.* **267**(5203):1494-1498.
- Chen-Park F.E., Huang D.B., Noro B., Thanos D. y Ghosh G. (2002) The kappa B DNA sequence from the HIV long terminal repeat functions as an allosteric regulator of HIV transcription. *J. Biol. Chem.* **277**(27):24701-24708.
- Chiu V.K., Bivona T., Hach A., Sajous J.B., Silletti J., Wiener H., Johnson R.L., Cox A.D. y Philips M.R. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell. Biol.* **4**(5):343-50.
- Chung J.Y., Lu M., Yin Q. y Wu H. (2007) Structural revelations of TRAF2 function in TNF receptor signaling pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.* **597**:93-113.
- Clevers H. (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell.* **118**(6):671-674.
- Coley, W.B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* **105**:487-511.
- Colicelli J., Nicolette C., Birchmeier C., Rodgers L., Riggs M. y Wigler M. (1991) Expression of three mammalian cDNAs that interfere with RAS function in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(7):2913-2917.
- Conti G., Portincasa P., Visalli S. y Chezzi C. (2001) Inhibition by prostaglandin PGA1 on the multiplication of influenza virus is a dose-dependent effect. *Virus Res.* **75**(1):43-57.

Costa E.T., Forti F.L., Matos T.G., Dermargos A., Nakano F., Salotti J., Rocha K.M., Asprino P.F., Yoshihara C.K., Koga M.M. y Armelin H.A. (2008) Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res.* **68**(15):6215-6223.

Coussens L.M. y Werb Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature.* **420**(6917):860-867.

Das B., Gupta S., Vasanji A., Xu Z., Misra S. y Sen S. (2008) Nuclear Co-translocation of Myotrophin and p65 Stimulates Myocyte Growth: REGULATION BY MYOTROPHIN HAIRPIN LOOPS. *J. Biol. Chem.* **283**(41):27947-27956.

Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R. y Futreal P.A.. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* **417**(6892):949-954.

Davis R.J. (1999) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. Soc. Symp.* **64**:1-12.

De Álvaro C., Martínez N., Rojas J.M. y Lorenzo M. (2005) Sprouty-2 overexpression in C2C12 cells confers myogenic differentiation properties in the presence of FGF2. *Mol. Biol. Cell.* **16**(9):4454-4461.

Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C. y Chen Z.J. (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* **103**(2):351-361.

Devary Y., Rosette C., DiDonato J.A. y Karin M. (1993) NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science.* **261**(5127):1442-1445.

Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K.M., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E. y Mosialos (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **16** (12):7098-7108.

Devin A., Cook A., Lin Y., Rodriguez Y., Kelliher M. y Liu Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity.* **12**(4):419-429.

Devin A., Lin Y. y Liu Z.G. (2003) The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep.* **4**(6):623-627.

Devin A., Lin Y., Yamaoka S., Li Z., Karin M. y Liu Zg. (2001) The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol. Cell Biol.* **21**(12):3986-3994.

Di Fiore, P.P. y De Camili P. (2001) Endocytosis and signalling, an inseparable partnership. *Cell.* **106**(1):1-4.

- DiDonato J., Mercurio F., Rosette C., Wu-Li J., Suyang H., Ghosh S. y Karin M. (1996) Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**(4):1295-1304.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E. y Karin M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*. **388**(6642):548-554.
- Ding W. y Warburton D. (2008) Down-regulation of Sprouty2 via p38 MAPK plays a key role in the induction of cellular apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**(3):460-464.
- Ding W., Shi W., Bellusci S., Groffen J., Heisterkamp N., Minoo P. y Warburton D. (2007) Sprouty2 downregulation plays a pivotal role in mediating crosstalk between TGF-beta1 signaling and EGF as well as FGF receptor tyrosine kinase-ERK pathways in mesenchymal cells. *J. Cell Physiol.* **212**(3):796-806.
- Doheny H.C., O'Reilly M.J., Sexton D.J. y Morrison J.J. (2007) THG113.31, a specific PGF2alpha receptor antagonist, induces human myometrial relaxation and BKCa channel activation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **5**:10.
- Dutta J., Fan Y., Gupta N., Fan G. y Gélinas C. (2006) Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*. **25**(51):6800-6816.
- Ea C.K., Deng L., Xia Z.P., Pineda G. y Chen Z.J. (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell.* **22**(2):245-257.
- Egan J.E., Hall A.B., Yatsula B.A. y Bar-Sagi D. (2002) The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**(9):6041-6046.
- Ehlers S. (2003) Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann. Rheum. Dis.* **62** Suppl 2:ii37-42.
- Ehrhardt A., David M.D., Ehrhardt G.R.A. y Schrader J.W. (2004) Distinct Mechanisms Determine the Patterns of Differential Activation of H-Ras, N-Ras, K-Ras 4B, and M-Ras by Receptors for Growth Factors or Antigen. *Mol. Cell. Biol.* **24**(14): 6311-6323.
- Eliopoulos A.G., Das S. y Tsichlis P.N. (2006) The tyrosine kinase Syk regulates TPL2 activation signals. *J. Biol. Chem.* **281**(3):1371-1380.
- Eliopoulos A.G., Wang C.C., Dumitru C.D. y Tsichlis P.N. (2003) Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J.* **22**(15):3855-3864.
- Esteban L.M., Vicario-Abejón C., Fernández-Salguero P., Fernández-Medarde A., Swaminathan N., Yienger K., López E., Malumbres M., McKay R., Ward J.M., Pellicer A. y Santos E. (2001) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* **21**(5):1444-14452.
- Flati V., Pastore L.I., Griffioen A.W., Satijn S., Toniato E., D'Alimonte I., Laglia E., Marchetti P., Gulino A. y Martinotti S. (2006) Endothelial cell anergy is mediated by bFGF through the

sustained activation of p38-MAPK and NF-kappaB inhibition. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **19**(4):761-773.

Fong C.W., Leong H.F., Wong E.S., Lim J., Yusoff P. y Guy G.R. (2003) Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *J. Biol. Chem.* **278**(35):33456-33464.

Forman B.M., Tonotnoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M. y Evans R. M. (1995) 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**(5):803-812.

Frankel P., Ramos M., Flom J., Bychenok S., Joseph T., Kerkhoff E., Rapp U.R., Feig L.A. y Foster D.A. (1999) Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**(2):502-507.

Franzoso G., Bours V., Azarenko V., Park S., Tomita-Yamaguchi M., Kanno T., Brown K. y Siebenlist U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *EMBO J.* **12**(10):3893-3901.

Franzoso G., Bours V., Park S., Tomita-Yamaguchi M., Kelly K. y Siebenlist U. (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature.* **359**(6393):339-342.

Freitas T.R., Caldas L.A. y Rebello M.A. (2003) Effect of prostaglandin A1 in porcine cells persistently infected with classical swine fever virus. *J. Basic Microbiol.* **43**(6):468-472.

Freyer D., Manz R., Ziegenhorn A., Weih M., Angstwurm K., Döcke W.D., Meisel A., Schumann R.R., Schönfelder G., Dirnagl U. y Weber J.R. (1999) Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J. Immunol.* **163**(8):4308-4314.

Fujino G., Noguchi T., Matsuzawa A., Yamauchi S., Saitoh M., Takeda K. y Ichijo H. (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell Biol.* **27**(23):8152-8163.

Fujita T., Nolan G.P., Ghosh S. y Baltimore D. (1992) Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes Dev.* **6**(5):775-787.

Fujita T., Nolan G.P., Liou H.C., Scott M. y Baltimore D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev.* **7**(7B):1354-1363.

Funk C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* **294**(5548):1871-1875.

Galisteo M.L., Dikic I., Batzer A.G., Langdon W.Y. y Schlessinger J. (1995) Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J. Biol. Chem.* **270**(35):20242-20245.

García-Piñeres A.J., Castro V., Mora G., Schmidt T.J., Strunck E., Pahl H.L. y Merfort I. (2001) Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J. Biol. Chem.* **276**(43):39713-39720.

- García-Piñeres A.J., Lindenmeyer M.T. y Merfort I. (2004) Role of cysteine residues of p65/NF-kappaB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. *Life. Sci.* **75**(7):841-856.
- Gavin A.C. y Nebreda A.R. (1999) A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90^{rsk}/MAPKAP kinase-1. *Curr. Biol.* **9**(5):281-284.
- Gayarre J., Sánchez D., Sánchez-Gómez F.J., Terrón M.C., Llorca O y Pérez-Sala D. (2006) Addition of electrophilic lipids to actin alters filament structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**(4):1387-1393.
- Gayarre J., Stamatakis K., Renedo M. y Pérez-Sala D. (2005) Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett.* **579**(25):5803-5808.
- Ghosh S. y Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109 Suppl:S81-96.
- Gilmore T.D. (1999) Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene.* **18**(49):6925-6937.
- Giovannardi S., Forlani G., Balestrini M., Bossi E., Tonini R., Sturani E., Peres A. y Zippel R. (2002) Modulation of the inward rectifier potassium channel IRK1 by the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**(14):12158-12163.
- Goi T., Shipitsin M., Lu Z., Foster D.A, Klinz S.G. y Feig L.A. (2000) An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *EMBO J.* **19**(4):623-630.
- Goodwin J.S., Drake K.R., Rogers C., Wright L., Lippincott-Schwartz J., Philips M.R. y Kenworthy A.K. (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J. Cell Biol.* **170**(2):261-272.
- Gorfe A.A., Hanzal-Bayer M., Abankwa D., Hancock J.F. y McCammon J.A. (2007) Structure and dynamics of the full-length lipid-modified H-Ras protein in a 1,2-dimyristoylglycerol-3-phosphocholine bilayer. *J. Med. Chem.* **50**(4):674-684.
- Gross I., Bassit B., Benezra M. y Licht J.D. (2001) Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J. Biol. Chem.* **276**(49):46460-46468.
- Gupta D., Syed N.A., Roesler W.J. y Khandelwal R.L. (2004) Effect of overexpression and nuclear translocation of constitutively active PKB-alpha on cellular survival and proliferation in HepG2 cells. *J. Cell. Biochem.* **93**(3):513-525.
- Gupta S., Seth A. y Davis R.J. (1993) Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(8):3216-3220.
- Gustin J.A., Pincheira R., Mayo L.D., Ozes O.N., Kessler K.M., Baerwald M.R., Korgaonkar C.K. y Donner D.B. (2004) Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**(3):C547-555.
- Guttridge D.C., Mayo M.W., Madrid L.V., Wang C.Y. y Baldwin A. S. Jr. (2000) NF- κ B-Induced Loss of *MyoD* Messenger RNA: Possible Role in Muscle Decay and Cachexia. *Science.* **289**(5488):2363-2366.

- Guzmán M.L., Rossi R.M., Karnischky L., Li X., Peterson D.R., Howard D.S. y Jordan C.T. (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* **105**(11) 4163–4169.
- Guzmán M.L., Rossi R.M., Neelakantan S., Li X., Corbett C.A., Hassane D.C., Becker M.W., Bennett J.M., Sullivan E., Lachowicz J.L., Vaughan A., Sweeney C.J., Matthews W., Carroll M., Liesveld J.L., Crooks P.A. y Jordan C.T. (2007) An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. **110**(13):4427-4435.
- Habelhah H., Frew I.J., Laine A., Janes P.W., Relaix F., Sassoon D., Bowtell D.D. y Ronai Z. (2002) Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J.* **21**(21):5756-5765.
- Habelhah H., Takahashi S., Cho S.G., Kadoya T., Watanabe T. y Ronai Z. (2004) Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J.* **23**(2):322-332.
- Hacohen N., Kramer S., Sutherland D., Hiromi Y. y Krasnow M.A. (1998) Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell*. **92**(2):253-263.
- Haegeman G. (2003) Inhibition of signal transduction pathways involved in inflammation. *Eur. Respir. J. Suppl.* **44**:16s-19s.
- Haglund K., Schmidt M.H., Wong E.S., Guy G.R. y Dikic I. (2005) Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation. *EMBO Rep.* **6**(7):635-641.
- Haglund K., Sigismund S., Polo S., Szymkiewicz I., Di Fiore P.P. y Dikic I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5**(5):461–466.
- Hall A., Billinton A. y Giblin G.M. (2007) EP1 antagonists for the treatment of inflammatory pain. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **10**(5):597-612.
- Hanafusa H., Torii S., Yasunaga T. y Nishida E. (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* **4**(11):850-858.
- Hancock J. F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(6):456-462.
- Hancock J.F. y Parton R.G. (2005) Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem. J.* **389**(Pt 1):1-11.
- Hancock J.F., Cadwallader K., Paterson H. y Marshall C.J. (1991a) A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**(13):4033-4039.
- Hancock J.F., Cadwallader K., y Marshall C.J. (1991b). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J.* **10**(3):641-646.
- Hancock J.F., Magee A.I., Childs J.E., y Marshall C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**(7):1167-1177.
- Hancock J.F., Paterson H., y Marshal C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is

required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**(1):133-139.

Hatazawa R., Tanaka A., Tanigami M., Amagase K., Kato S., Ashida Y. y Takeuchi K. (2007) Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**(4):G788-797.

Haugh J.M. (2002) Localization of receptor-Mediated Signal Transduction Pathways: the inside Story. *Mol. Interv.* **2**(5):292-307.

Haugsten E.M., Sørensen V., Brech A., Olsnes S. y Wesche J. (2005) Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 17):3869-3881.

Hayes M.M., Lane B.R., King S.R., Markovitz D.M. y Coffey M.J. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit HIV-1 replication in macrophages by transcriptional and post-transcriptional effects. *J. Biol. Chem.* **277**(19):16913-1699.

Henry D.O., Moskalenko S.A., Kaur K.J., Fu M., Pestell R.G., Camonis J.H. y White M.A. (2000) Ral GTPases Contribute to Regulation of Cyclin D1 through Activation of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* **20**(21): 8084-8092.

Herrmann C., Martin G.A. y Wittinghofer A. (1995) Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**(7):2901-2905.

Hevener A.L., Olefsky J.M., Reichart D., Nguyen M.T., Bandyopadhyay G., Leung H.Y., Watt M.J., Benner C., Febbraio M.A., Nguyen A.K., Folian B., Subramaniam S., Gonzalez F.J., Glass C.K. y Ricote M. (2007) Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **117**(6):1658-1669.

Hewamana S., Alghazal S., Lin T.T., Clement M., Jenkins C., Guzman M.L., Jordan C.T., Neelakantan S., Crooks P.A., Burnett A.K., Pratt G., Fegan C., Rowntree C., Brennan P. y Pepper C. (2008) The NF- κ B subunit, Rel A, is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukaemia and represents a promising therapeutic target. *Blood*. **111**(9):4681-4689.

Hildt E. y Oess S. (1999) Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *J. Exp. Med.* **189**(11):1707-1714.

Hoffmann A., Leung T.H. y Baltimore D. (2003) Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* **22**(20):5530-5539.

Hoffmann A., Natoli G. y Ghosh G. (2006) Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. **25**(51):6706-6716.

Homem de Bittencourt P.I. Jr, Lagranha D.J., Maslinkiewicz A., Senna S.M., Tavares A.M., Baldissera L.P., Janner D.R., Peralta J.S., Bock P.M., Gutiérrez L.L., Scola G., Heck T.G., Krause M.S., Cruz L.A., Abdalla D.S., Lagranha C.J., Lima T. y Curi R. (2007) LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. **193**(2):245-258.

- Hortelano S., Castrillo A., Álvarez A.M. y Boscá L. (2000) Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J. Immunol.* **165**(11):6525-6531.
- Hsu C.H. y Cheng A.L. (2007) Clinical studies with curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**:471-80.
- Hsu H., Huang J., Shu H.B., Baichwal V. y Goeddel D.V. (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* **4**(4):387-396.
- Hsu H., Shu H.B., Pan M.G. y Goeddel D.V. (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**(2):299-308.
- Hsu H., Xiong J. y Goeddel D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B Activation. *Cell* **81**(4):495-504.
- Hu G., Chung Y.L., Glover T., Valentine V., Look A.T. y Fearon E.R. (1997) Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics.* **46** (1):103-111.
- Huang L., Weng X., Hofer F., Martin G.S. y Kim S.H. (1997) Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nat. Struct. Biol.* **4**(8):609-615.
- Huang T.T., Kudo N., Yoshida M. y Miyamoto S. (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(3):1014-1019.
- Huang W.C., Chen J.J. y Chen C.C. (2003a) c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKK β is involved in tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem.* **278**(11):9944-5992.
- Huang W.C., Chen J.J., Inoue H. y Chen C.C. (2003b) Tyrosine phosphorylation of I- κ B kinase α/β by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression. *J. Immunol.* **170**(9):4767-4775.
- Husebye H., Halaas Ø., Stenmark H., Tunheim G., Sandanger Ø., Bogen B., Brech A., Latz E. y Espevik T. (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* **25**(4):683-692.
- Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K. y Gotoh Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* **275**(5296):90-94.
- Ichiki T., Tokunou T., Fukuyama K., Iino N., Masuda S. y Takeshita A. (2004) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones transactivate epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**(2):402-408.
- Impagnatiello M.A., Weitzer S., Gannon G., Compagni A., Cotten M. y Christofori G. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **152**(5):1087-1098.
- Jiang Y., Woronicz J.D., Liu W. y Goeddel D.V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science.* **283**(5401):543-546.

- Johnson C., Van Antwerp D. y Hope T.J. (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *EMBO J.* **18**(23):6682-6693.
- Jorge R., Zarich N., Oliva J.L., Azañedo M., Martínez N., de la Cruz X. y Rojas J.M. (2002) HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its pleckstrin homology domain.. *J. Biol. Chem.* **277**(46):44171-44179.
- Jung Y., Xu W., Kim H., Ha N. y Neckers L. (2007) Curcumin-induced degradation of ErbB2: A role for the E3 ubiquitin ligase CHIP and the Michael reaction acceptor activity of curcumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1773**(3):383-390.
- Kabashima K., Sakata D., Nagamachi M., Miyachi Y., Inaba K. y Narumiya S. (2003) Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat. Med.* **9**(6):744-749.
- Kanayama A., Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Hong M., Shaito A., Chiu Y.H., Deng L. y Chen Z.J. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell.* **15**(4):535-548.
- Kaneko I., Hishinuma T., Suzuki K., Owada Y., Kitanaka N., Kondo H., Goto J., Furukawa H. y Ono M. (2008) Prostaglandin F(2 α) regulates cytokine responses of mast cells through the receptors for prostaglandin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**(3):590-596.
- Karg K., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Cracowski J.C., Laporte F. y Mueller M.J. (2007) Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition. *Free Radic. Res.* **41**(1):25-37.
- Karin M. (1998) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades as Regulators of Stress Responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **851**: 139-146.
- Kaye K.M., Devergne O., Harada J.N., Izumi K.M., Yalamanchili R., Kieff E. y Mosialos G. (1996) Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**(20):11085-11090.
- Keats J.J., Fonseca R., Chesi M., Schop R., Baker A., Chng W.J., Van Wier S., Tiedemann R., Shi C.X., Sebag M., Braggio E., Henry T., Zhu Y.X., Fogle H., Price-Troska T., Ahmann G., Mancini C., Brents L.A., Kumar S., Greipp P., Dispenzieri A., Bryant B., Mulligan G., Bruhn L., Barrett M., Valdez R., Trent J., Stewart A.K., Carpten J. y Bergsagel P.L. (2007) Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell.* **12**(2):131-144.
- Kelley G.G., Reks S.E., Ondrako J.M. y Smrcka A.V. (2001) Phospholipase C(ϵ): a novel Ras effector. *EMBO J.* **20**(4):743-754.
- Khosrowbeygi A. y Zarghami N. (2007) Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **77**(2):117-121.
- Kikuchi A. y Williams L.T. (1994) The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation. *J. Biol. Chem.* **269**(31):20054-20059.
- Kim H.J., Hawke N. y Baldwin A.S. (2006) NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ.* **13**(5):738-747.

- Kim H.J., Taylor L.J. y Bar-Sagi D. (2007a) Spatial regulation of EGFR signaling by Sprouty2. *Curr. Biol.* **17**(5):455-461.
- Kim J.W., Joe C.O. y Choi E.J. (2001) Role of receptor-interacting protein in tumor necrosis factor- α -dependent MEKK1 activation. *J. Biol. Chem.* **276**(29):27064-27070.
- Kim W.J., Kim J.H. y Jang S.K. (2007b) Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J.* **26**(24):5020-5032.
- Klein O.D., Minowada G., Peterkova R., Kangas A., Yu B.D., Lesot H., Peterka M., Jernvall J. y Martin G.R. (2006) Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev. Cell.* **11**(2):181-190.
- Kliwer S. A., Lenhard J. M., Willson T. M., Patel I., Morris D. C. y Lehmann, J. M. (1995) A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**(5):813-819.
- Knuefermann P., Chen P., Misra A., Shi S.P., Abdellatif M. y Sivasubramanian N. (2002) Myotrophin/V-1, a protein up-regulated in the failing human heart and in postnatal cerebellum, converts NF κ B p50-p65 heterodimers to p50-p50 and p65-p65 homodimers. *J. Biol. Chem.* **277**(26):23888-23897.
- Kramer S., Okabe M., Hacohen N., Krasnow M.A. y Hiromi Y. (1999) Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development.* **126**(11):2515-2525.
- Krappmann D. y Scheidereit C. (2005) A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep.* **6**(4):321-326.
- Kriegler M., Pérez C., DeFay K., Albert I. y Lu S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* **53**(1):45-53.
- Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y. y Gélinas C. (2003) To be, or not to be: NF- κ B is the answer--role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* **22**(56):8961-8982.
- Kumar V., Zhang M.X., Swank M.W., Kunz J. y Wu G.Y. (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* **25**(49):11288-11299.
- Kumazawa M., Iida H., Uchida M., Iida M., Takenaka M. y Dohi S. (2007) The comparative effects of intravenous nicardipine and prostaglandin E1 on the cerebral pial arteriolar constriction seen after unclamping of an aortic cross-clamp in rabbits. *Anesth. Analg.* **104**(3):659-665.
- Kunsch C., Ruben S.M. y Rosen C.A. (1992) Selection of optimal κ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- κ B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**(10):4412-4421.
- Kwabi-Addo B., Wang J., Erdem H., Vaid A., Castro P., Ayala G., y Ittmann M. (2004) The Expression of Sprouty1, an Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Signal Transduction, Is Decreased in Human Prostate Cancer. *Cancer Res.* **64**(14): 4728-4735.

- Kwok, B.H., Koh, B., Ndubuisi, M.I., Elofsson, M. y Crews, C.M. (2001) The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase. *Chem. Biol.* **8**(8):759-766.
- Lambert J.M., Lambert Q.T., Reuther G.W., Malliri A., Siderovski D.P., Sondek J., Collard J.G. y Der C.J. (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat. Cell. Biol.* **4**(8):621-625.
- Lander H.M., Hajjar D.P., Hempstead B.L., Mirza U.A., Chait B.T., Campbel, S. y Quilliam, L.A. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J. Biol. Chem.* **272**(7):4323-4326.
- Lander H.M., Ogiste J.S., Teng K.K. y Novogrodsky A. (1995) p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* **270**(36):21195-21198.
- Lao D.H., Chandramouli S., Yusoff P., Fong C.W., Saw T.Y., Tai L.P., Yu C.Y., Leong H.F. y Guy G.R. (2006) A Src homology 3-binding sequence on the C terminus of Sprouty2 is necessary for inhibition of the Ras/ERK pathway downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* **281**(40):29993-30000.
- Lao D.H., Yusoff P., Chandramouli S., Philp R.J., Fong C.W., Jackson R.A., Saw T.Y., Yu C.Y. y Guy G.R. (2007) Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* **282**(12):9117-91126.
- Lazarus M., Yoshida K., Coppari R., Bass C.E., Mochizuki T., Lowell B.B. y Saper C.B. (2007) EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat. Neurosci.* **10**(9):1131-1133.
- Lee S.A., Ho C., Roy R., Kosinski C., Patil M.A., Tward A.D., Fridlyand J. y Chen X. (2008) Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer. *Hepatology.* **47**(4):1200-1210.
- Lee S.H., Schloss D.J., Jarvis L., Krasnow M.A. y Swain J.L. (2001) Inhibition of angiogenesis by a mouse sprouty protein. *J. Biol. Chem.* **276**(6):4128-4133.
- Lee T.H., Shank J., Cusson N. y Kelliher M.A. (2004) The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J. Biol. Chem.* **279**(32):33185-33191.
- Leibovitz A., Stinson J.C., McCombs W.B. 3rd, McCoy C.E., Mazur K.C. y Mabry N-D. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* **36**(12):4562-4569.
- Leung T.H., Hoffmann A. y Baltimore D. (2004) One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell.* **118**(4):453-464.
- Li X., Brunton V.G., Burgar H.R., Wheldon L.M. y Heath J.K. (2004) FRS2-dependent SRC activation is required for fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of Sprouty and suppression of ERK activity. *J. Cell. Sci.* **117**(Pt 25):6007-6017.
- Lim J., Wong E.S., Ong S.H., Yusoff P., Low B.C. y Guy G.R. (2000) Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation. Identification of a novel translocation domain. *J. Biol. Chem.* **275**(42):32837-32845.

- Lim J., Yusoff P., Wong E.S., Chandramouli S., Lao D.H., Fong C.W. y Guy G.R. (2002) The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol. Cell. Biol.* **22**(22):7953-7966.
- Liu H., Nishitoh H., Ichijo H. y Kyriakis J.M. (2000) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell Biol.* **20**(6):2198-2208.
- Liu J.D., Lin S.Y., Ho Y.S., Pan S., Hung L.F., Tsai S.H., Lin J.K. y Liang Y.C. (2003) Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol. Carcinog.* **37**(1):16-24.
- Liu Z.G. y Han J. (2001) Cellular responses to tumor necrosis factor. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**(4):79-90.
- Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.V. y Karin M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* **87**(3):565-576.
- Lo T.L., Fong C.W., Yusoff P., McKie A.B., Chua M.S., Leung H.Y. y Guy G.R. (2006) Sprouty and cancer: the first terms report. *Cancer Lett.* **242**(2):141-150.
- Lo T.L., Yusoff P., Fong C.W., Guo K., Mccaw B.J., Phillips W.A., Yang H., Wong E.S., Leong H. F., Zeng Q., Putti T.C. y Guy G.R. (2004) The Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Inhibitor and Likely Tumor Suppressor Proteins, Sprouty 1 and Sprouty 2 Are Deregulated in Breast Cancer. *Cancer. Research.* **64**(17):6127-6136.
- Lowy D.R. y Willumsen B.M. (1993) Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:851-891.
- Lu J-Y. y Hofmann S.L. (1995) Depalmitoylation of CAAX motif proteins. Protein structural determinants of palmitate turnover rate. *J. Biol. Chem.* **270** (13):7251-7256.
- Magee A.I., Gutiérrez L., McKay I.A., Marshall C.J. y Hall A. (1987) Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J.* **6**(11):3353-3357.
- Marais R., Wynne J. y Treisman R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell.* **73**(2):381-393.
- Marcu M.G., Jung Y.J., Lee S., Chung E.J., Lee M.J., Trepel J. y Neckers L (2006) Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med. Chem.* **2**(2):169-174.
- Martínez N., García-Domínguez C.A., Domingo B., Oliva J.L., Zarich N., Sánchez A., Gutiérrez-Eisman S., Llopis J. y Rojas J.M. (2007) Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction. *Cell Signal.* **19**(11):2277-2285.
- Marui N., Medford R.M. y Ahmad M. (2005) Activation of RelA homodimers by tumour necrosis factor alpha: a possible transcriptional activator in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **390**(Pt 1):317-324.
- Mason J.M., Morrison D.J., Bassit B., Dimri M., Band H., Licht J.D. y Gross I. (2004) Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop. *Mol. Biol. Cell.* **15**(5):2176-2188.

- Mason J.M., Morrison D.J., Basson M.A. y Licht J.D. (2006) Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol.* **16**(1):45-54.
- Mattson M.P. y Meffert M.K. (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell. Death Differ.* **13**(5):852-860.
- Mazid M.A., Chowdhury A.A., Nagao K., Nishimura K., Jisaka M., Nagaya T. y Yokota K. (2006) Endogenous 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage. *FEBS Lett.* **580**(30):6885-6890.
- McCarthy J.V., Ni J. y Dixit V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**(27):16968-16975.
- Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J., Young D.B., Barbosa M., Mann M., Manning A. y Rao A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* **278**(5339):860-866.
- Micheau O. y Tschopp J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* **114**(2):181-190.
- Millán O., Ballester A., Castrillo A., Oliva J.L., Través P.G., Rojas J.M. y Boscá L. (2003) H Ras-specific activation of NF-κB protects against stimulus-dependent apoptosis. *Oncogene* **22**(4):477-483.
- Millán O., Rico D., Peinado H., Zarich N., Stamatakis K., Pérez-Sala D., Rojas J.M., Cano A. y Boscá L. (2006) Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **27**(2):328-336.
- Minowada G., Jarvis L.A., Chi C.L., Neubüser A., Sun X., Hacohen N., Krasnow M.A. y Martin G.R. (1999) Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development.* **126**(20):4465-4475.
- Moriguchi T., Toyoshima F., Masuyama N., Hanafusa H., Gotoh Y. y Nishida E. (1997) A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J.* **16**(23):7045-53.
- Mosesson Y., Shtiegman K., Katz M., Zwang Y., Vereb G., Szollosi J. y Yarden Y. (2003) Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by mono-, not poly-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **278**(4): 31323–31326.
- Mott H.R., Carpenter J.W. y Campbell S.L. (1997). Structural and functional analysis of a mutant Ras protein that is insensitive to nitric oxide activation. *Biochemistry.* **36**(12):3640-3644.
- Munzert G., Kirchner D., Ottmann O., Bergmann L. y Schmid R.M. (2004) Constitutive NF-kappab/Rel activation in philadelphia chromosome positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk. Lymphoma.* **45**(6):1181-1184.
- Nadeau R.J., Toher J.L., Yang X., Kovalenko D. y Friesel R. (2007) Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. *J. Cell Biochem.* **100**(1):151-160.
- Nagarajan R.P., Chen F., Li W., Vig E., Harrington M.A., Nakshatri H. y Chen Y. (2000) Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappaB. *Biochem. J.* **348**(Pt 3):591-596.

- Nakane A., Minagawa T. y Kato K. (1988) Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* **56**(10):2563-2569.
- Nakanishi C. y Toi M. (2005) Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* **5**(4):297-309.
- Nakashima S., Morinaka K., Koyama S., Ikeda M., Kishida M., Okawa K., Iwamatsu A., Kishida S. y Kikuchi A. (1999) Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J.* **18**(13):3629-3642.
- Nakshatri H., Bhat-Nakshatri P., Martin D.A., Goulet R.J. y Sledge G.W. (1997) Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.* **17**(7):3629-3639.
- Natoli G. y De Santa F. (2006) Shaping alternative NF- κ B-dependent gene expression programs: new clues to specificity. *Cell Death. Differ.* **13**(5):693-696.
- Navas T. A., Baldwin D. T. y Stewart T. A. (1999). RIP2 Is a Raf1-activated Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* **274**(47):33684-33690.
- Nelson D.E., Ihekweaba A.E., Elliott M., Johnson J.R., Gibney C.A., Foreman B.E., Nelson G., See V., Horton C.A., Spiller D.G., Edwards S.W., McDowell H.P., Unitt J.F., Sullivan E., Grimley R., Benson N., Broomhead D., Kell D.B. y White M.R. (2004) Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* **306**(5696):704-708.
- Nosjean O. y Boutin J.A. (2002) Natural ligands of PPAR γ : are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal.* **14**(7):573-583.
- Oh J.Y., Giles N.M., Landar A.L. y Darley-Usmar V. (2008) Accumulation of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defense induction. *Biochem. J.* **411**(2):297-306.
- Ohta Y., Suzuki N., Nakamura S., Hartwig J.H. y Stossel T.P. (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**(5):2122-2128.
- Oka D., Nishimura K., Shiba M., Nakai Y., Arai Y., Nakayama M., Takayama H., Inoue H., Okuyama A. y Nonomura N. (2007) Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF- κ B. *Int. J. Cancer.* **120**(12):2576-2581.
- Oliva J.L., (2002) Análisis Funcional de la Región Efectora de las Proteínas, H-Ras, N-Ras y K-Ras. Papel de la Proteína Sur-8. Tesis Doctoral por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Universidad de Alcalá, Madrid.
- Oliva J.L., Pérez-Sala D., Castrillo A., Martínez N., Canada F.J., Boscá L. y Rojas J.M. (2003) The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**(8):4772-4777.
- Oliva J.L., Zarich N., Martínez N., Jorge R., Castrillo A., Azanedo M., García-Vargas S., Gutiérrez-Eisman S., Juarranz A., Boscá L., Gutkind J.S. y Rojas J.M. (2004) The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras. *J. Biol. Chem.* **279**(32):33480-33491.

- Ostman, A. y Böhmer, F-D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends. Cell Biol.* **11**(6):258-266.
- Pae H.O., Jeong G.S., Jeong S.O., Kim H.S., Kim S.A., Kim Y.C., Yoo S.J., Kim H.D. y Chung H. T. (2007) Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cells. *Exp. Mol. Med.* **39**(3):267-277.
- Pae H.O., Jeong S.O., Jeong G.S., Kim K.M., Kim H.S., Kim S.A., Kim Y.C., Kang S.D., Kim B.N. y Chung H.T. (2007) Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**(4):1040-1045.
- Pálmer H.G., González-Sancho J.M., Espada J., Berciano M.T., Puig I., Baulida J., Quintanilla M., Cano A., de Herreros A.G., Lafarga M. y Muñoz A. (2001) Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.* **154**(2):369-387.
- Pálmer HG, Sánchez-Carbayo M, Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Cerdón-Cardó C, Muñoz A. (2003) Genetic signatures of differentiation induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer. Res.* **63**(22):7799-7806.
- Papa S., Zazzeroni F., Pham C.G., Bubici C. y Franzoso G. (2004) Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 22):5197-5208.
- Park Y.C., Burkitt V., Villa A.R., Tong L. y Wu H. (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature.* **398**(6727):533-538.
- Pawson T. (2002) Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur. J. Cancer* **38**(Suppl 5): S3-S10.
- Pérez de Castro I, Bivona T.G., Philips M.R. y Pellicer A. (2004) Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol. Cell. Biol.* **24** (8):3485-3496.
- Pérez de Castro I., Díaz R., Malumbres M., Hernández M.I., Jagirdar J., Jiménez M., Ahn D. y Pellicer A. (2003) Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function. *Cancer Res.* **63**(7):1615-1622.
- Pérez-Sala D., Cernuda-Morollón E. y Cañada F.J. (2003) Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.* **278**(51):51251-51260.
- Perkins N.D. (2004) Regulation of NF-kappaB by atypical activators and tumour suppressors. *Biochem. Soc. Trans.* **32**(Pt 6):936-939.
- Perkins N.D. (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* **25**(51):6717-6730.
- Perkins N.D. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(1):49-62.
- Perl A.K., Hokuto I., Impagnatiello M.A., Christofori G. y Whitsett J.A. (2003) Temporal effects of Sprouty on lung morphogenesis. *Dev. Biol.* **258**(1):154-168.

- Petrova T.V., Akama K.T. y Van Eldik, L.J. (1999) Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**(8):4668-4673.
- Pincheira R., Castro A.F., Ozes O.N., Idumalla P.S. y Donner D.B. (2008) Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *J. Immunol.* **181**(2):1288-1298.
- Polekhina G., House C.M., Traficante N., Mackay J.P., Relaix F., Sassoon D.A., Parker M.W. y Bowtell D.D. (2002) Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat. Struct. Biol.* **9**(1):68-75.
- Pullen S.S., Dang T.T., Crute J.J. y Kehry M.R. (1999) CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J. Biol. Chem.* **274**(20):14246-14254.
- Pullen S.S., Miller H.G., Everdeen D.S., Dang T.T., Crute J.J. y Kehry M.R. (1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry.* **37**(34):11836-11845.
- Rao K.M. (2001) MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **69**(1):3-10.
- Reich A., Sapir A., Shilo B. (1999) Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development.* **126**(18):4139-4147.
- Reinhard C., Shamoon B., Shyamala V. y Williams L.T. (1997) Tumor necrosis factor α -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2 **16**(5):1080-1092.
- Renedo M., Gayarre J., García-Domínguez C.A., Pérez-Rodríguez A., Prieto A., Cañada F.J., Rojas J.M. y Pérez-Sala D. (2007) Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry.* **46**(22):6607-6616.
- Ritchie M.H., Fillmore R.A., Lausch R.N. y Oakes J.E. (2004) A role for NF-kappa B binding motifs in the differential induction of chemokine gene expression in human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**(7):2299-2305.
- Robertson S.C., Tynan J.A. y Donoghue D.J. (2000) RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends. Genet.* **16**(6):265-271.
- Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P.J., Koerner C., Lumbierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A. y Bastiaens P.I. (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science.* **307**(5716):1746-1752.
- Rojas J.M. y Santos E. (2002). The *ras* genes and human cancer: different implications and different roles. *Current. Genomics.* **3**:295-311.
- Rojas J.M. y Santos E. (2006) Ras-Gefs and Ras Gaps *Proteins and Cell Regulation* **4**:15-43.
- Rossi A., Elia G. y Santoro M.G. (1996) 2-Cyclopenten-1-one, a new inducer of heat shock protein 70 with antiviral activity. *J. Biol. Chem.* **271**(50):32192-32196.
- Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M. y Santoro M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**(6765):103-108.

- Rothe M., Wong S.C., Henzel W.J. y Goeddel D.V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. **78**(4):681-692.
- Rothe M., Xiong J., Shu H.B., Williamson K., Goddard A. y Goeddel D.V. (1996) I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **93**(16):8241-8246.
- Rothwarf D.M., Zandi E., Natoli G. y Karin M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*. **395**(6699):297-300.
- Roy S., Plowman S., Rotblat B., Prior I.A., Muncke C., Grainger S., Parton R.G., Henis Y.I., Kloog Y. y Hancock J.F. (2005) Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol. Cell. Biol.* **25**(15):6722-6733.
- Rual J.F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G.F., Gibbons F.D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D.S., Zhang L.V., Wong S.L., Franklin G., Li S., Albala J.S., Lim J., Fraughton C., Llamas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R.S., Vandenhaute J., Zoghbi H.Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M.E., Hill D.E., Roth F.P. y Vidal M. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*. **437** (7062):1173-1178.
- Rubin C., Litvak V., Medvedovsky H., Zwang Y., Lev S. y Yarden Y. (2003) Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr. Biol.* **13**(4):297-307.
- Rubin C., Zwang Y., Vaisman N., Ron D. y Yarden Y. (2005) Phosphorylation of carboxyl-terminal tyrosines modulates the specificity of Sprouty-2 inhibition of different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **280**(10):9735-9744.
- Saccani S., Pantano S. y Natoli G. (2003) Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol. Cell*. **11**(6):1563-1574.
- Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K. y Ichijo H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. **17**(9):2596-2606.
- Sánchez A., Setién F., Martínez N., Oliva J.L., Herranz M., Fraga M.F., Alaminos M., Esteller M. y Rojas J.M. (2008) Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas. *Oncogene*. **27**(36):4969-4972.
- Sánchez-Gómez F.J., Cernuda-Morollón E., Stamatakis K. y Pérez-Sala D. (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol. Pharmacol.* **66**(5):1349-1358.
- Sasaki A., Taketomi T., Kato R., Saeki K., Nonami A., Sasaki M., Kuriyama M., Saito N., Shibuya M. y Yoshimura A. (2003) Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat. Cell Biol.* **5**(5):427-432.
- Sasaki A., Taketomi T., Wakioka T., Kato R. y Yoshimura A. (2001) Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *J. Biol. Chem.* **276**(39):36804-36808.

- Sasaki C.Y., Barberi T.J., Ghosh P., Longo D.L. (2005) Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I κ B α -independent NF- κ B pathway. *J. Biol. Chem.* **280**(41):34538–34547.
- Scheidereit C. (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*. **25**(51):6685-6705.
- Schlessinger J. (2000) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**(2):211-225.
- Schneider-Brachert W., Tchikov V., Merkel O., Jakob M., Hallas C., Kruse M.L., Groitl P., Lehn A., Hildt E., Held-Feindt J., Dobner T., Kabelitz D., Krönke M. y Schütze S. (2006) Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* **116**(11):2901-2913.
- Schneider-Brachert W., Tchikov V., Neumeyer J., Jakob M., Winoto-Morbach S., Held-Feindt J., Heinrich M., Merkel O., Ehrenschröder M., Adam D., Mentlein R., Kabelitz D. y Schütze S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. **21**(3):415-428.
- Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F.R., Krähn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S.C. (2001) Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*. **293**(5534):1495-1499.
- Senna S.M., Moraes R.B., Bravo M.F., Oliveira R.R., Miotto G.C., Vidor A.C., Belló-Klein A., Irigoyen M.C., Belló A.A., Curi R. y Homem de Bittencourt P.I. Jr. (1998) Effects of prostaglandins and nitric oxide on rat macrophage lipid metabolism in culture: implications for arterial wall-leukocyte interplay in atherosclerosis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**(5):1007-1018.
- Sethi G., Ahn K.S., Chaturvedi M.M. y Aggarwal B.B. (2007) Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor-kappaB through IkappaB α kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of IkappaB α . *Oncogene*. **26**(52):7324-7332.
- Shan Z.Z., Masuko-Hongo K., Dai S.M., Nakamura H., Kato T. y Nishioka K. (2004) A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J. Biol. Chem.* **279**(36):37939-37950.
- Shaw A.T., Meissner A., Dowdle J.A., Crowley D., Magendantz M., Ouyang C., Parisi T., Rajagopal J., Blank L.J., Bronson R.T., Stone J.R., Tuveson D.A., Jaenisch R. y Jacks T. (2007) Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis *Genes. Dev.* **21**(6):694-707.
- Shen Y.H., Godlewski J., Zhu J., Sathyanarayana P., Leaner V., Birrer M.J., Rana A. y Tzivion G. (2003) Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK Pathways: SUSTAINED ACTIVATION OF JNK BLOCKS ERK ACTIVATION BY MITOGENIC FACTORS *J. Biol. Chem.* **278**(29):26715-26721.
- Shi C.S. y Kehrl J.H. (2003) Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J. Biol. Chem.* **278**(17):15429-15434.
- Shi Q., Bao S., Maxwell J.A., Reese E.D., Friedman H.S., Bigner D.D., Wang X.F. y Rich J.N. (2004) Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J. Biol. Chem.* **279**(50):52200-52209.

- Shim J.H., Xiao C., Paschal A.E., Bailey S.T., Rao P., Hayden M.S., Lee K.Y., Bussey C., Steckel M., Tanaka N., Yamada G., Akira S., Matsumoto K. y Ghosh S. (2005b) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* **19**(22):2668-2681.
- Shim K., Minowada G., Coling D.E. y Martin G.R. (2005a) Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev. Cell.* **8**(4):553-564.
- Shiraki T., Kamiya N., Shiki S., Kodama T. S. y Jingami, H. (2005) α,β -unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.* **280**(14):14145–14153.
- Spaargaren M. y Bischoff J.R. (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**(26):12609-12613.
- Stamatakis K., Sánchez-Gómez F.J. y Pérez-Sala D. (2006) Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**(1):89-98.
- Stark C, Breitkreutz B.J., Reguly T., Boucher L., Breitkreutz A. y, Tyers M. (2006) BioGRID: A General Repository for Interaction Datasets. *Nucleic. Acids Res.* **34**:D535-539.
- Stark L.A. y Dunlop M.G. (2005) Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-kappaB-driven transcription and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **25**(14):5985-6004.
- Straus D.S. y Glass C.K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* **21**(3):185-210.
- Straus D.S., Pascual G., Li M., Welch J.S., Ricote M., Hsiang C.H., Sengchanthalangsy L.L. y Ghosh G., Glass C.K. (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(9):4844-4849.
- Sun L. y Chen Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(2):119-126.
- Sutterlüty H., Mayer C.E., Setinek U., Attems J., Ovtcharov S., Mikula M., Mikulits W., Micksche M. y Berger W. (2007) Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res.* **5**(5):509-520.
- Tada K., Okazaki T., Sakon S., Kobarai T., Kurosawa K., Yamaoka S., Hashimoto H., Mak T.W., Yagita H., Okumura K., Yeh W.C. y Nakano H. (2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J. Biol. Chem.* **276**(39):36530-36534.
- Takada Y., Mukhopadhyay A., Kundu G.C., Mahabeleshwar G.H., Singh S. y Aggarwal B.B. (2003) Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **278**(26):24233-24241.
- Takahashi C., Bronson R.T., Socolovsky M., Contreras B., Lee K.Y., Jacks T., Noda M., Kucherlapati R. y Ewen M.E. *Rb and N-ras Function Together To Control Differentiation in the Mouse* (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**(15):5256-5268.

- Takahashi S., Odani N., Tomokiyo K., Furuta K., Suzuki M., Ichikawa A. y Negishi M. (1998) Localization of a cyclopentenone prostaglandin to the endoplasmic reticulum and induction of BiP mRNA. *Biochem. J.* **335** (Pt 1):35-42.
- Taketomi T., Yoshiga D., Taniguchi K., Kobayashi T., Nonami A., Kato R., Sasaki M., Sasaki A., Ishibashi H., Moriyama M., Nakamura K., Nishimura J., Yoshimura A. (2005) Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat. Neurosci.* **8**(7):855-857.
- Tang C.H., Yang R.S., Chen Y.F. y Fu W.M. (2007) Basic fibroblast growth factor stimulates fibronectin expression through phospholipase C gamma, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappaB, and p300 pathway in osteoblasts. *J. Cell Physiol.* **211**(1):45-55.
- Tang P., Hung M-C y Klostergaard J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry.* **35**(25):8216-8225.
- Tang X., Liu D., Shishodia S., Ozburn N., Behrens C., Lee J.J., Hong W.K., Aggarwal B.B. y Wistuba I.I. (2006) Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer.* **107**(11):2637-2646.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H. y Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* **74**(5):845-853.
- Taylor S.J. y Shalloway D. (1996) Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr. Biol.* **6** (12):1621-1627.
- Tefft D., Lee M., Smith S., Crowe D.L., Bellusci S. y Warburton D. (2002) mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**(4):L700-706.
- Tefft J.D., Lee M., Smith S., Leinwand M., Zhao J., Bringas P. Jr, Crowe D.L. y Warburton D. (1999) Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr. Biol.* **9**(4):219-222.
- Thomas S.C., Ryan M.A., Shanley T.P. y Wong H.R. (1998) Induction of the stress response with prostaglandin A1 increases I-kappaBalpha gene expression. *FASEB J.* **12** (13):1371-1378.
- Thome M., Hofmann K., Burns K., Martinon F., Bodmer J.L., Mattmann C. y Tschopp J. (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr. Biol.* **8**(15):885-888.
- Tian T., Harding A., Inder K., Plowman S., Parton R.G. y Hancock J.F. (2007) Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat. Cell Biol.* **9**(8):905-914.
- Tong L.A., de Vos A.M, Milburn M.V. y Kim S.H. (1991) Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J. Mol. Biol.* **217**(3):503-516.
- Tournier C., Dong C., Turner T.K., Jones S.N., Flavell R.A. y Davis R.J. (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* **15**(11):1419-1426.

- Trainer D.L., Kline T., McCabe F.L., Faucette L.F., Feild J., Chaikin M., Anzano M., Rieman D., Hoffstein S., Li D.J., Gennaro D., Buscarino C., Lynch M., Poste G. y Greig R. (1988) Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines *Int. J. Cancer*. **41**(2):287-296.
- Tsavachidou D., Coleman M.L., Athanasiadis G., Li S., Licht J.D., Olson M.F. y Weber B.L. (2004) SPRY2 Is an Inhibitor of the Ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Melanocytes and Melanoma Cells with Wild-Type *BRAF* but Not with the V599E Mutant. *Cancer. Res.* **64**(16): 5556-5559.
- Tsutsumi R., Fukata Y. y Fukata M. (2008) Discovery of protein-palmitoylating enzymes *Pflugers Arch.* **456**(6):1199-1206.
- Ueda Y., Su Y. y Richmond A. (2007) CCAAT displacement protein regulates nuclear factor-kappa beta-mediated chemokine transcription in melanoma cells. *Melanoma Res.* **17**(2):91-103.
- Uren A.G. y Vaux D.L. (1996) TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.* **21** (7):244-245.
- Vanden Berghe W., Plaisance S., Boone E., De Bosscher K., Schmitz M.L., Fiers W. y Haegeman G. (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **273**(6):3285-3290.
- Vermeulen L., De Wilde G., Van Damme P., Vanden Berghe W. y Haegeman G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* **22**(6):1313-1324.
- Voboril R. y Weberova-Voborilova J. (2006) Constitutive NF-kappaB activity in colorectal cancer cells: impact on radiation-induced NF-kappaB activity, radiosensitivity, and apoptosis. *Neoplasma.* **53**(6):518-523.
- Voice J.K., Klemke R.L., Le A. y Jackson J.H. (1999) Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* **274**(24):17164-17170.
- Wajant H., Pfizenmaier K. y Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* **10**(1):45-65.
- Wakioka T., Sasaki A., Kato R., Shouda T., Matsumoto A., Miyoshi K., Tsuneoka M., Komiya S., Baron R. y Yoshimura A. (2001) Spry is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature.* **412**(6847):647-651.
- Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K. (2008) Structural Insight into PPARgamma Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *J. Mol. Biol.* Oct 19. [Epub ahead of print]
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J. y Chen Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* **412**(6844):346-351.
- Wang Y., Sun X., Wu J., Xu B.E., Gu C., Wang H., Wang X., Tan F., Peng X., Qiang B., Yuan J. y Luo Y. (2008) Casein kinase 1alpha interacts with RIP1 and regulates NF-kappaB activation. *Biochemistry.* **47**(1):441-448.
- Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G. y Cooper J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16** (8):1909-1920.

- Wendel H.G., De Stanchina E., Fridman J.S., Malina A., Ray S., Kogan S., Cordon-Cardo C., Pelletier J. y Lowe S.W. (2004) Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*. **428**(6980):332-337.
- Wennerberg K., Rossman K.L. y Der C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 5):843-846.
- Werth V.P., Bashir M.M. y Zhang W. (2003) IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor alpha from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **120**(1):116-122.
- Westerheide S.D., Mayo M.W., Anest V., Hanson J.L. y Baldwin A.S. Jr. (2001) The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol. Cell Biol.* **21**(24):8428-8436.
- Willumsen B.M., Christensen A., Hubbert N.L., Papageorge A.G. y Lowy D.R. (1984) The p21 Ras C terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**(5978):583-586.
- Wolthuis R.M., Zwartkruis F., Moen T.C. y Bos J.L. (1998) Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr. Biol.* **8**(8):471-474.
- Wong E.S., Fong C.W., Lim J., Yusoff P., Low B.C., Langdon W.Y. y Guy G.R. (2002) Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.* **21**(18):4796-4808.
- Wong E.S., Lim J., Low B.C., Chen Q. y Guy G.R. (2001) Evidence for direct interaction between Sprouty and Cbl. *J. Biol. Chem.* **276**(8):5866-5875
- Wright L.P. y Philips M.R. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res.* **47**(5):883-891.
- Wu C.J., Conze D.B., Li T., Srinivasula S.M. y Ashwell J.D. (2006) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.* **8**(4):398-406.
- Wu C.J., Conze D.B., Li X., Ying S.X., Hanover J.A. y Ashwell J.D. (2005) TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J.* **24**(10):1886-1898.
- Wullaert A., Heyninck K. y Beyaert R. (2006) Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **72**(9):1090-1101.
- Xiao G., Cvijic M.E., Fong A., Harhaj E.W., Uhlik M.T., Waterfield M. y Sun S.C. (2001) Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J.* **20**(23):6805-6815.
- Xu L.G., Li L.Y. y Shu H.B. (2004) TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**(17):17278-17282.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J. y Israël A. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*. **93**(7):1231-1240.

- Yamaoka T., Yan F., Cao H., Hobbs S.S., Dise R.S., Tong W. y Polk D.B. (2008) Transactivation of EGF receptor and ErbB2 protects intestinal epithelial cells from TNF-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**(33):11772-11777.
- Yang J., Lin Y., Guo Z., Cheng J., Huang J., Deng L., Liao W., Chen Z., Liu Z. y Su B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat. Immunol.* **2**(7):620-624.
- Ye H. y Wu H. (2000) Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**(16): 8961–8966.
- Yeh W.C., Shahinian A., Speiser D., Kraunus J., Billia F., Wakeham A., de la Pompa J.L., Ferrick D., Hum B., Iscove N., Ohashi P., Rothe M., Goeddel D.V. y Mak T.W. (1997) Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity.* **7**(5):715-725.
- Yigzaw Y., Cartin L., Pierre S., Scholich K. y Patel T.B. (2001) The C terminus of sprouty is important for modulation of cellular migration and proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**(25):22742-22747.
- Yusoff P., Lao D.H., Ong S.H., Wong E.S., Lim J., Lo T.L., Leong H.F., Fong C.W. y Guy G.R. (2002) Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J. Biol. Chem.* **277**(5):3195-3201.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M. y Karin M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* **91**(2):243-252.
- Zarich N., Oliva J.L., Jorge R., Santos E. y Rojas J.M. (2000) The isoform-specific stretch of hSos1 defines a new Grb2-binding domain. *Oncogene* **19**(51):5872-5883.
- Zhang H., Ma G., Dong M., Zhao M., Shen X., Ma Z. y Guo K. (2006) Epidermal growth factor promotes invasiveness of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-mediated proteinase productions. *Pancreas.* **32**(1):101-109.
- Zhang S.Q., Kovalenko A., Cantarella G. y Wallach D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity.* **12**(3):301-311.
- Zhang X., Chen H.Z. y Rovin B.H. (2003) Unexpected sensitivity of synthetic Renilla luciferase control vectors to treatment with a cyclopentenone prostaglandin. *Biotechniques.* **35** (6):1144-1146, 1148.
- Zhong H., May M.J., Jimi E. y Ghosh S. (2002) Phosphorylation of NF-κB determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.* **9**(3):625-636.
- Zohar M., Teramoto H., Katz B.Z., Yamada K.M. y Gutkind J.S. (1998) Effector domain mutants of Rho dissociate cytoskeletal changes from nuclear signaling and cellular transformation. *Oncogene* **17**(8):991-998.